MEMORIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TOMO I

COM 13 ESTAMPAS E 22 FIGURAS NO TEXTO

RIO DE JANEIRO - MANGUINHOS

1909

INDICE

FACICULO I

GIEMSA (G.) e GODOY (A.) — **Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico** (1 figura no texto) 3

Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta.** Uma nova mutuca, da subfamilia: *Pangoninae* (Estampa 1) 12

Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **O sôro anti-pestozo** 14

Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Contribuições para o conhecimento da fauna indijena de Tabanidas** 28

Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Sobre a Amoeba diplomitotica n. sp.** Contribuição para o estudo da divizão nuclear nas amebas (Estampa 2) 33

Drs. H. de BEAUREPAIRE ARAGÃO e ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos parazitas intraglobulares dos lacertidas.** *Plasmodium diploglossi* n. sp. *Plasmodium tropiduri* n. sp. (Estampa 3) . 44

Dr. A. FONTES — **Estudos sobre a tuberculoze** (2 figuras no texto) 51

Dr. ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos dipteros.** Observações sobre a biolojia e sistematica das anofelinas brazileiras e suas relações com o impaludismo (Estampa 4) 69

GIEMSA (G.) u. GODOY (A.) — **Ueber Filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphterieserum zu konzentrieren** (1 Text-Figur) 3

Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta.** Eine neue Tabanidenart aus der Subfamilie: *Pangoninae* (Tafel 1) 12

Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **Le sérum anti-pesteux.** 14

Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Beiträge zur Kenntniss der einheimischen Tabanidenfauna** . 28

Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Ueber eine neue Amoebenart, Amoeba diplomitotica.** Beitrag zum Studium der Kernteilung bei den Amoeben (Tafel 2) 33

Drs. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO and ARTHUR NEIVA — **Two new species of Plasmodium,** *Pl. diploglossi* and *Pl. tropiduri.* A contribution to the study of the endoglobular parasites os the lizards (Plate 3) 44

Dr. A. FONTES — **Etudes sur la tuberculose** (2 Text-Figuren) 51

Dr. ARTHUR NEIVA — **Beitrag zur Kenntniss der Dipteren.** Beobachtungen über die Biologie und Systematik der brasilianischen Anophelinen und deren Beziehungen mit der Malaria (Tafel 4) 69

FACICULO II

Dr. S. von PROWAZEK — **Contribuição para o estudo do dezenvolvimento do "Spirochaeta gallinarum"** (7 figuras no texto) 79

Dr. ALCIDES GODOY — **Multiplicação dos bacterios em cultura.** I. Constante de velocidade de multiplicação 81

Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** Novo parazito do anú azul, Crotophaga maior. L. (Estampa 5) 99

Dr. S. von PROWAZEK — **Duplicidade morfolojica nos infuzorios ciliados** (Estampa 6). 105

Dr. ARTHUR MOSES — **Da pesquiza de antijeno e de anticorpo pela fixação de complemento** 109

Dr. ADOLPHO LUTZ — **Contribuição para o conhecimento das especies brazileiras do genero "Simulium"** . 124

Drs. S. von PROWAZEK e H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Estudos sobre a variola** (2 figuras no texto e estampas 7 e 8) 147

Dr. CARLOS CHAGAS — **Nova tripanozomiaze humana.** Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem (10 figuras no texto e estampas 9—13 159

Dr. S. von PROWAZEK — **Zur Entwicklung von "Spirochaeta gallinarum"** (7 Text-Figuren). 79

Dr. ALCIDES GODOY — **Ueber die Vermehrung der Bacterien in den Culturen.** I. Die Constante ihrer Geschwindigkeit 81

Dr. GOMES DE FARIA — **Echinostomum crotophagae, n. sp.** A new parasite of the blue anú, Crotophaga maior. L. (With plate 5) 99

Dr. S. von PROWAZEK — **Formodimorphismus bei ciliaten Infusorien** (Tafel 6) 105

Dr. ARTHUR MOSES — **Ueber den Nachweis von Antigen und Antikörper durch Komplementablenkung** . . 109

Dr. ADOLPHO LUTZ — **Beitrag zur Kenntniss der brasilianischen Simuliumarten** 124

Drs. S. von PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Variola-Untersuchungen.** (2 Text-Figuren und Tafel 7 und 8). 147

Dr. CARLOS CHAGAS — **Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.** Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Erreger einer neuen Krankheit des Menschen (10 Text-Figuren und Tafel 9—13) 159

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/memorias-do-instituto-oswaldo-cruz_1909_1_1

TOMO I FACICULO I

MEMORIAS

DO

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RIO DE JANEIRO — MANGUINHOS

ABRIL DE 1909

SUMARIO:

I — GIEMSA (G.) e GODOY (A.) — **Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico** (1 figura no texto) 3

II — Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta.** Uma nova mutuca, da subfamilia: *Pangoninae* (Estampa 1) 12

III — Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **O sôro anti-pestozo** 14

IV — Drs. ADOLPHO LUTZ e ARTHUR NEIVA — **Contribuições para o conhecimento da fauna indijena de Tabanidas** 28

V — Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Sobre a Amoeba diplomitotica n. sp.** Contribuição para o estudo da divizão nuclear nas amebas (Estampa 2) 33

VI — Drs. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO e ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos parazitas intraglobulares dos lacertidas.** *Plasmodium diploglossi* n.sp. *Plasmodium tropiduri* n.sp. (Est. 3) 44

VII — Dr. A. FONTES — **Estudos sobre a tuberculoze** (2 figuras no texto) 51

VIII — Dr. ARTHUR NEIVA — **Contribuição para o estudo dos dipteros.** Observações sobre a biolojia e sistematica das anofelinas brazileiras e suas relações com o impaludismo (Estampa 4) . . . 69

SOMMAIRE:

I — GIEMSA (G.) u. GODOY (A.) — **Ueber filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphterieserum zu konzentrieren** (1 Text-Figur) 3

II — Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Erephopsis auricincta.** Eine neue Tabanidenart aus der Subfamilie: *Pangoninae* (Tafel 1) 12

III — Dr. FIGUEIREDO VASCONCELLOS — **Le sérum anti-pesteux** 14

IV — Dr. ADOLPHO LUTZ u. Dr. ARTHUR NEIVA — **Beiträge zur Kentniss der einheimischen Tabanidenfauna** 28

V — Dr. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO — **Ueber eine neue Amoebenart, Amoeba diplomitotica.** Beitrag zum Studium der Kernteilung bei den Amoeben (Tafel 2) 33

VI — Drs. H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO and ARTHUR NEIVA — **Two new species of Plasmodium,** *Pl. diploglossi* and *Pl. tropiduri.* A contribution to the study of the endoglobular parasites of the lizards (Plate 3) 44

VII — Dr. A. FONTES — **Etudes sur la tuberculose** (2 Text-Figuren) 51

VIII — Dr. ARTHUR NEIVA — **Beitrag zur Kentniss der Dipteren.** Beobachtungen über die Biologie und Systematik der brasilianischen Anophelinen und deren Beziehungen mit der Malaria (Tafel 4) . 69

AVIZO

As «MEMORIAS» serão publicadas em faciculos, que não aparecerão em datas fixas e que formarão volumes de mais ou menos 200 pajinas. No minimo, aparecerá um volume por ano.

Na parte escrita em portuguez foi adotada a grafia aconselhada pela Academia de Letras do Rio de Janeiro.

Toda correspondencia relativa ás «MEMORIAS» deverá ser dirijida ao **"Diretor do Instituto Oswaldo Cruz - Caixa postal 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

AVIS

Les «MEMOIRES» seront publiés par fascicules qui ne paraitront pas en epoques determinées et qui formeront des volumes d'a peu près 200 pages. Il paraitra chaque année, au moins, un volume.

La partie portugaise est écrite selon la graphie adoptée par l'Académie de Lettres de Rio de Janeiro.

Toute correspondance doit être adressée au **"Directeur de l'Institut Oswaldo Cruz — Caisse postale 926 - Manguinhos - Rio de Janeiro".**

Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico

pelos Drs.

G. Giemsa e A. Godoy

Ueber Filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphtherieserum zu konzentrieren

von

G. Giemsa und A. Godoy

A filtração de coloides dissolvidos atravez de gelatina de que se ocuparam já Martin, Bechholds, Malfitano, e Duclaux, tem adquirido, especialmente depois dos interessantes trabalhos de Bechholds, extraordinaria importancia.

De notavel valor são as pesquizas de Bechholds, em que, com o aparelho por elle construido e chamado de ultrafiltração, mostrou pela primeira vez que se podia variar a permeabilidade do filtro com modificar a concentração da geléa, e que, por filtros de diferentes permeabilidades se podia em filtrações fracionadas separar uns dos outros coloides de diferentes tamanhos de particulas. A tão promissoras perspectivas, que para a bioquimica em geral abria este metodo de filtração, já Bechholds se referiu em seu trabalho.

Será talvez de interesse lembrar aqui que no dominio da microbiolojia, notadamente no estudo dos chamados ajentes ultraviziveis, a filtração pelos gelatino-coloides já se mostrou de vantajem. Assim poderam Prowazek e Giemsa demonstrar, que pela ultrafiltração de material nativo de *Hühnerpest,* o qual como se sabe é infeciozo, mesmo na diluição de 1 : 1000 milhões, é o virus retido pelo filtro de modo a se obter sempre um filtrado com-

Die Filtration gelöster Kolloide durch Gallerte, mit welcher sich zuerst Martin (1), Malfitano (3), Borrel (3), Manca (3) und Duclaux (3) beschäftigten, hat bekanntlich durch die interessanten Arbeiten Bechholds (2) ausserordentlich an Bedeutung gewonnen.

Von besonderer Wichtigkeit sind die Versuche Bechholds, in denen er mit Hilfe eines von ihm konstruierten sog. Ultrafiltrationsapparates als Erster nachweisen konnte, dass sich die Filterdichte durch Aenderung der Gallertkonzentration beliebig variiren lässt und dass sich durch verschieden dichte Filter Kolloide verschiedener Teilchengrösse durch fraktionierte Filtrationen voneinander trennen lassen. Auf die überaus mannigfachen Perspektiven, die uns diese Filtrationsmethode für die gesamte Biochemie etc. eröffnet, hat Bechhold bereits in seinen Arbeiten hingewiesen.

Es dürfte vielleicht von Interesse sein, an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Filtration durch Kolloidgallerte auf parasitologischem Gebiete, namentlich beim Studium sogenannter ultravisibiler Erreger, bereits Vorteilhaftes geleistet hat. So konnten Prowazek und Giemsa (4) zeigen, dass es bei der Ultrafiltration von frischem Hühnerpestmaterial, das bekanntlich noch in einer Verdünnung von 1 : 1000 Millionen infektiös ist, mit absoluter Sicherheit gelingt, das Virus im Filter zurückzuhal-

pletamente inocuo; pela filtração em vela Chamberland-Pasteur isto acontece raras vezes, e pelo uzo de filtros mais grosseiros nunca se dá. O mesmo tem lugar para o cauzador da variola descrito por Prowazek e Aragão.

Requerem-se as condições seguintes para demonstração em estado puro desses microorganismos: filtrar primeiramente atravez uma vela esteril de *largos póros*, porem verificada impermeavel para as bacterias (por ex. uma vela de porcelana comum de Berkefeld), separa-se assim as bacterias existentes, podendo-se, então, supor que no filtrado só se encontra o chamado germen ultravizivel em estado de pureza, com o qual se poderá, daí por deante, proceder de modos diversos. Por processo semelhante se conseguiu, como resalta no mesmo trabalho, izolar os ajentes da variola e da *Hühnerpest* até aí desconhecidos ou ainda não diagnosticados com segurança. Aquilo que resta na ultrafiltração sobre a camada superficial de um filtro de grandes poros coberto de agar, lavado com agua fiziologica de clorureto de sodio, com o fim de separar o mais possivel a parte seroza, é finalmente tornado por esse meio sucetivel de coloração, e a cor revela nitidamente como formas muito pequenas. Indicações exatas sobre a membrana de agar aí empregada — vela de Pukal coberta com agar a 3 % — funcionando por pressão reduzida, são encontradas nos orijinais referidos.

A operação com este filtro não é sómente muito mais comoda, mas oferece notaveis vantajens sobre o aparelho de Bechholds como pudemos verificar.

Podia ser que este metodo fosse tambem utilizavel em estudos soro-biolojicos, e então, na experiencia, se conseguisse, com o emprego de filtros de diferentes graus de permeabilidade, obter o enriquecimento dos anticorpos existentes no soro antidifterico, simultaneamente com a separação dos componentes do soro sem importancia para a sua ação curativa. Como vantajens de nosso metodo de filtração pelo vacuo podemos indicar as seguintes:

ten und stets ein vollkommen unschädliches steriles Filtrat zu erhalten, während dies bekanntlich bei der Filtration durch Chamberland-Pasteur-Kerzen nur selten, bei Anwendung noch gröberer Bakterienfilter nie gelingt. Dasselbe gilt für den von Prowazek und Aragão (5) beschriebenen Erreger der Variola. Hieraus sind aber auch folgende für die Reindarstellung dieser Mikroorganismen wichtigen Schlüsse zu ziehen: Filtriert man das in einer genügenden Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Material zunächst durch ein steriles, *weitporiges*, aber bekanntermassen für Bakterien dichtes Filter, z. B. durch eine gewöhnliche Berkefeld'sche Kieselgurkerze, siebt man auf diese Weise die Bakterien gewissermassen ab, so muss man annehmen, dass man es im Filtrat nunmehr mit einer Reinkultur der sogenannten ultravisibilen Erreger zu thun hat, mit der man dann nach den verschiedensten Richtungen hin weiter operieren kann. Auf ähnliche Weise gelang es denn auch, wie aus denselben Arbeiten hervorgeht, die bis dahin unbekannten, bezw. noch nicht mit genügender Sicherheit diagnostizierten Erreger der Hühnerpest und Variola zunächst zu isolieren, sie durch Ultrafiltration auf der obersten Schicht einer weitporigen Agargallerte zurückzuhalten, durch Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung von den serösen Bestandteilen möglichst zu trennen, und sie schliesslich, nachdem sie so für die färberische Darstellung geeigneter gemacht worden waren, durch Tinktion als äusserst kleine Gebilde sehr schön zur Anschauung zu bringen. Genaue Angaben bezüglich der damals benutzten Gallertmembranen — mit 1 bezw. 3 %-igem Agar überschichtete Pukalkerzen etc. —, bei denen mit Minusdruck gearbeitet wurde, befinden sich in den betreffenden Originalien.

Da sich das Operieren mit diesen Filtern nicht nur sehr bequem gestaltete, sondern dem Arbeiten mit dem Bechhold'schen Apparat gegenüber manch andere bemerkenswerte Vorteile zu bieten schien, entschlossen wir uns, diese Methode auch serobiologischen Studien nutzbar zu machen und zwar zunächst zu versuchen, ob es gelänge, bei Anwendung ver-

1) Observámos já em pesquizas preliminares, que pelo emprego do nosso aparelho — ao menos no que se refere á filtração de soro de cavalo — não se dá separação ou gelatinização do coloide, como por exemplo, observou Bechholds na ultra-filtração de soro de coelho nem solidificação no sentido de Duclaux. Pelo nosso metodo de filtração, o soro conserva, mesmo quando pela ultrafiltração foi concentrado até a consistencia xaropóza, o estado de liquido homojeneo e o filtro possue, como resalta da aproximada igualdade do reziduo seco em cada uma das frações da filtração, do começo ao fim a mesma permeabilidade para os soroproteinas. Se esta observação rezulta unicamente do vazio regular obtido pela trompa de agua ou, mais provavelmente da diferença essencial da ação da pressão ou do vacuo, só outras pesquizas poderão decidir.
2) Nosso aparelho torna superfluo o emprego de um ajitador, porque os coloides concentrados em virtude de um maior pezo especifico decem da superficie da vela para o fundo e aí se reunem, emquanto que o filtro é sempre envolvido por soro diluido que se adiciona.
3) O trabalho pelo vacuo permite seguir exatamente com a vista todo o curso da filtração, quer no soro filtrado, quer no restante.
4) Nosso aparelho é extraordinariamente barato e facil para se preparar.

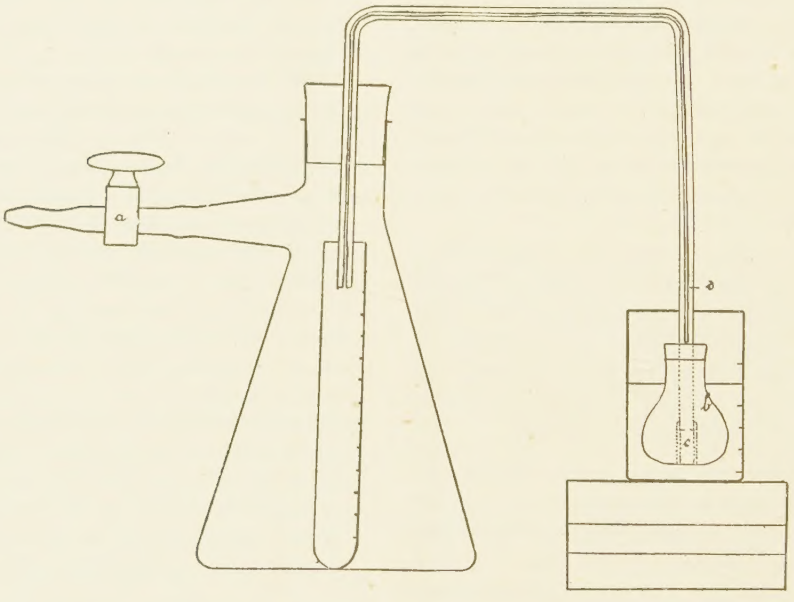
A camada de agar sobre a vela de Pukal obtem-se com facilidade; todo o aparelho não difere esencialmente do já descrito por Prowazek e Giemsa, e compreende-se sem dificuldade pelo dezenho junto. E' esterilizado no autoclave; depois de frio mergulha-se a vela 3—4 vezes em agar liquefeito e esfriado a 50°, depois, com o fim de solidificar o coloide, coloca-se a vela em um cristalizador esfriado por gelo e no fundo agua para que não seque a camada de agar. Com algum exercicio obtem-se facilmente por este modo uma ca-

schieden dichter Filter im Diphterieserum eine Anreicherung von Antikörpern zu erzielen unter gleichzeitiger Abscheidung der für die Heilwirkung irrelevanten Serumbestandteile. Die Vorteile unserer Vacuum-Filtrationsmethode glauben wir hauptsächlich in folgenden Punkten erblicken zu müssen.

1) Wie wir schon gelegentlich einiger Vorversuche beobachteten, findet bei dem Arbeiten mit unserem Apparat — wenigstens soweit es sich um die Filtration von Pferdeblutserum handelt — ein Abscheiden bezw. ein Gelatinieren des Kolloids, wie es z. B. Bechhold bei der Ultrafiltration von Kaninchenserum beobachtete, eine sog. Solidifikation im Sinne Duclaux's nicht statt. Bei unserer Filtration bewahrte das Serum, selbst wenn es bis zu Sirupdicke durch Ultrafiltration eingeengt war, stets seinen homogenen flüssigen Zustand und die Filter zeigten dementsprechend, wie aus den annähernd gleichbleibenden Trockenrückständen der einzelnen Filtratsfraktionen hervorgeht, am Anfang wie am Ende der Filtration ziemlich dieselbe Durchlässigkeit für die Serumproteine. Ob diese Beobachtung lediglich auf den mässigen, durch die Wasserstrahlluftpumpe erzielbaren Druck zurückzuführen ist, oder, was wahrscheinlicher ist, auf prinzipielle Unterschiede, die zwischen der Wirkung von Druck bezw. Minusdruck obwalten, muss späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.
2) Unser Apparat macht einen Rührer überflüssig, da das konzentrierte Kolloid des höheren spezifischen Gewichtes wegen am Kerzenrand zu Boden sinkt und sich dort ansammelt, während das Filter immer mit dem nachfliessenden dünneren Serum umspült wird.
3) Das Arbeiten im Vacuum gestattet es, den ganzen Verlauf des Filtrationsprozesses, sowohl was Filtrat, wie Rückstand anbelangt, mit dem Auge genau verfolgen zu können.
4) Unser Apparat ist ausserordentlich leicht und wohlfeil herzustellen.

mada homojenea de agar. A camada de agar comporta-se um pouco dezigualmente, segundo a sua espessura, não no que diz respeito ao tamanho dos seus póros, que é o que sómente tem importancia. Durante a formação da camada, a torneira *a* deve se conservar aberta para que o calor que transmite o agar á vela de Pukal não determine pressão alguma no aparelho e por conseguinte a formação de bolhas na camada de agar solidificado. Pequenas bolhas de ar que se formam sobre o agar, rezultantes de introdução muito rapida do filtro no coloide, podem facilmente eliminar-se pela aproximação de um fio de platina incandecente do logar em que ellas se encontram, quer a massa esteja liquida, quer já solidificada. Para se obter filtrados estereis é necessario intercalar entre o tubo que tem a torneira *a* e o tubo aspirador uma pequena bola cheia de algodão antes de se fazer a esterilização no autoclave. No tubo *b* coloca-se um pedaço de tubo de borracha com o fim de evitar que seja perfurado o filtro na introdução do capilar. Em lugar do filtro de Pukal pode-se, naturalmente, empregar ou-

Das Ueberschichten der Pukalzellen mit Agar wurde folgendermassen bewerkstelligt: Der ganze Apparat, der in der Hauptsache dem bereits früher von Prowazek und Giemsa (4) beschriebenen gleicht und dessen Anordnung ohne weiteres aus der beigegebenen Zeichnung ersichtlich ist, wurde zunächst im Dampftopf sterilisiert, darauf abgekühlt und die Zelle etwa bis d abwechselnd 3—4 mal bald in die flüssige, auf 50° abgekühlte Agarlösung hineingetaucht, bald behufs Erstarrens des Kolloids in einen eisgekühlten Zylinder gebracht, dessen Boden mit Wasser bedeckt war, um das Eintrocknen der Agargallerte zu verhindern. Bei einiger Uebung lässt sich auf diese Weise leicht eine homogene Ueberschichtung erzielen. Die Gallerte fällt zwar bezüglich der Dicke der Schicht etwas ungleich aus, nicht jedoch, worauf es in erster Linie ankommt, bezüglich ihrer Porengrösse. Während des Ueberschichtens ist Hahn a zu öffnen, damit sich infolge der Wärme, die sich von der Agarlösung auf die Pukalkerze überträgt, kein Ueberdruck im Apparat und als Folge hiervon Blasen in der erstarrenden



tro como o de Berkefeld, Chamberland etc., assim tambem a forma pode ser outra qualquer, alem da reprezentada no dezenho, tal como a cilindrica. A preparação da camada de celoidina é feita do mesmo modo, somente, porem, é a propria filtração limitada em virtude da penetração de grande quantidade de agua nos póros do coloide solidificado que continha o meio dissolvente. Para a preparação da solução de agar uza-se somente agua distilada. Para o modo de se comportar durante a filtração não é indiferente empregar-se como suporte da camada de coloide que depois deve ser solidificada uma vela humida ou seca. No primeiro cazo, temos uma camada superficial; ao contrario, no segundo, em que uma camada se forma penetrando na vela, observa-se que a filtração se procede mais rapidamente não se dando a imbibição. Este fato é interessante não só teorica como praticamente. Uma camada melhor se obtem esfriando previamente a vela de Pukal em agua gelada antes de mergulhar no agar pouco quente. A gelatina, devido ao tempo para se solidificar, apropria-se pouco, ou mesmo nada, para o revestimento.

Diversas pesquizas preliminares feitas com celoidina, gelatina e agar nos mostraram que o ultimo é o que mais se apropria ao nosso fim; ao contrario da gelatina consegue-se facilmente que o agar se solidifique, mesmo quando a temperatura ambiente é alta; em contrapozição com a celoidina, no agar não é o liquido intermicelar facilmente volatil, de modo que com elle se pode obter um filtro esteril e de tamanho avaliavel de póros.

Para se fazer idéa da permeabilidade do material de filtro que uzámos, filtrámos soro de cavalo atravez de membranas de agar de diferentes grandezas de póros, assim como de celoidina, durante o tempo necessario á passajem de metade da quantidade primitiva atravez do filtro com a camada. A tabella I rezume os rezultados obtidos, e aí assinalámos os reziduos solidos na sua maioria constituidos por substancias albuminoides e o reziduo da incineração indicando os sáes inorganicos correspondentes ao soro filtrado e ao concentrado.

Agarschicht bilden. Kleine Luftbläschen, die mitunter infolge zu schnellen Eintauchens des Filters in den Agar auf der Gallerte entstehen, lassen sich leicht durch Annäherung eines glühenden Platindrahtes an die betreffenden Stellen der flüssigen oder in Erstarrung begriffenen Masse entfernen. Um sterile Filtrate zu erzielen, ist es notwendig, zwischen dem Rohr, an welchem Hahn a angebracht ist, und dem Saugschlauch eine mit Watte gefüllte Vorlage anzubringen, bevor die Sterilisation des ganzen Apparates im Dampftopf erfolgt. Am Rohr b ist ein Gummischlauch angebracht, der ein Durchstossen der Filterzelle beim Einfügen der Capillare verhindert. Anstatt der Pukalfilter kann man natürlich auch solche nach Berkefeld, Chamberland etc. benutzen, ebenso ist man durchaus nicht an die in der Zeichnung angegebene Form des Filters gebunden, sondern kann auch mit Zylindern u. dergl. arbeiten. Die Zelloidinüberschichtung geschah in ähnlicher Weise, nur wurde vor der eigentlichen Filtration das in den Poren des erstarrenden Kolloids befindliche Lösungsmittel durch Hindurchsaugen grösserer Wassermengen verdrängt. Zur Bereitung der Agarlösung diente ausschliesslich destilliertes Wasser. Für den zeitigen Verlauf der Filtration war es nicht ganz gleichgültig, ob man die Kolloidlösung, die später zur Filtergallerte erstarren sollte, auf einer feuchten oder trockenen Pukalkerze zum Gelatinieren gebracht hatte. In ersterem Falle, in welchem man es mit einem *Ueber-* anstatt mit einem *Durchschichten* der Kerze zu thun hat, beobachtet man, dass die Filtration stets schneller vonstatten geht als bei durchtränktem Pukal. Diese Tatsache ist ebenso theoretisch interessant wie praktisch bedeutsam.

Das *Ueber*schichten mit Agar gelingt am besten, wenn man die Pukalkerze vor dem Eintauchen in die mässig warme Agarlösung in Eiswasser kühlt. Gelatine eignet sich wegen ihres langsamen Erstarrens zum *Ueber*schichten wenig oder garnicht.

Verschiedene Vorversuche, die mit Cozelloidin-, Gelatine- und Agarfiltern angestellt wurden, liessen uns erkennen, dass sich letztere am besten für unsere Zwecke eigneten; im

Quadro I

Soro normal de cavalo

Filtração em	Pela filtração concentrou-se soro normal de		Reziduo seco de 10 cc. em gr.		Reziduo de incineração de 10 cc. em gr.		Côr
		Soro orijinal	0.924		0.055		amarelado
Agar 1 %	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	1.220		0.072		amarelo
		Filtrado $^{3}/_{10}$		0.641		0.040	amarelado
		Filtrado $^{8}/_{10}$		0.639		0.039	amarelado
Agar 3%	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	1.541		0.078		amarelo escuro
		Filtrado $^{3}/_{10}$		0.290		0.036	quazi incolor
		Filtrado $^{8}/_{10}$		0.272		0.035	quazi incolor
Celoidina	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	1.602		0.070		amarelo escuro
		Filtrado $^{3}/_{10}$		0.242		0.046	incolor
		Filtrado $^{8}/_{10}$		0.240		0.044	incolor

Quadro II

Soro antidifterico

Filtração em	Pela filtração concentrou-se		Reziduo seco de 10 cc. em gr.		Reziduo de incineração de 10 cc. em gr.		Unidades imunizantes	Côr
		Soro orijinal	0.975		0.058		150-200	amarelado
Agar 1%	300 cc. á 60 cc.	Soro concentrado	2.120		0.099		200-300	amarelo
		Soro filtrado		0.670		0.042	40-80	amarelado
Agar 3%	300 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	2.340		0.104		400-500	amarelo escuro
		Soro filtrado		0.278		0.035	menos de 10	quazi incolor

Tabelle I

Normalpferdeblutserum

Filtration durch:	Es wurden vom Normalserum durch Filtration eingeengt		Trockenrückstand aus 10 cc. in g.		Glührückstand aus 10 cc. in g.		Farbe
		Originalserum	0.924		0.055		gelblich
Agar 1%	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	1.220		0.072		gelb
		Filtrat $^{3}/_{10}$		0.641		0.040	gelblich
		Filtrat $^{8}/_{10}$		0.639		0.039	gelblich
Agar 3%	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	1.541		0.078		tiefgelb
		Filtrat $^{3}/_{10}$		0.290		0.036	fast farblos
		Filtrat $^{8}/_{10}$		0.272		0.035	fast farblos
Zelloidin	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	1.602		0.070		tiefgelb
		Filtrat $^{3}/_{10}$		0.242		0.046	farbloss
		Filtrat $^{8}/_{10}$		0.240		0.044	farbloss

Tabelle II

Diphtherieserum

Filtration durch:	Es wurden durch Filtration eingeengt		Trockenrückstand aus 10 cc. in g.		Glührückstand aus 10 cc. in g.		Immunitäts-einheiten	Farbe
		Originalserum	0.975		0.058		150-200	gelblich
Agar 1%	300 cc. auf 60 cc.	Concentr. Serum	2.120		0.099		200-300	gelb
		Filtrate (gemischt)		0.670		0.042	40-80	gelblich
Agar 3%	300 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	2.340		0.104		400-500	tiefgelb
		Filtrate (gemischt)		0.278		0.035	unter 10	fast farblos

O desecamento foi feito no vacuo sobre acido sulfurico e a incineração ao vermelho rubro e em todos os cazos até pezo constante. Debaixo da rubrica 3 do quadro encontramos a dezignação $^{3}/_{10}$ e $^{8}/_{10}$ que se deve entender como a terceira, ou oitava fração de 10 cc do filtrado. O resto do filtrado não foi minuciozamente pesquizado.

Os valores contidos no quadro mostram claramente que possuimos no agar um material de filtro apropriado para demonstrar com evidencia o fenomeno Bechholds. Aí vemos que, o agar a 1 % é mais permeavel para os coloides do soro que o agar a 3 %; que o agar a 3 % não permite a passajem da materia córante do soro o que não fazem os póros do agar a 1 %. Um filtro de celoidina mostra-se ainda menos permeavel para a materia córante e para os albuminoides que uma membrana de agar a 3 %.

De mais interesse são os rezultados da avaliação do reziduo de incineração. Indicam que os valores obtidos no filtrado são notavelmente menores que os referentes ao soro concentrado ou ao orijinal.

Compreende-se por si, que a só avaliação do pezo não seja suficiente para responder si se dá aqui como fato predominante a adsorção do clorureto de sodio aos coloides do soro concentrado ou se os valores a mais se referem simplesmente ás substancias inorganicas (fosforo, calcio, etc.) que estando ligadas aos albuminoides do soro creceriam naturalmente á medida que o soro se concentrasse, e que, portanto, deveriam ser calculados separadamente. A rezolução desta questão será mais tarde obtida por meio de pesquizas especiais neste sentido e no que se refere em particular á dozagem quantitativa exata dos sais inorganicos no filtrado e no soro concentrado, notadamente no que diz respeito ao clorureto de sodio.

A filtração do soro antidifterico foi feita de modo semelhante ao do soro normal, sendo porém o aparelho protejido da luz. Servimo-nos aqui tambem do filtro com camada superficial. A compozição do soro orijinal, do soro concentrado, e do ultrafiltrado

Gegensatz zu Gelatine liess sich der Agar bei der hier herrschenden hohen Lufttemperatur leichter zum Erstarren bringen, im Gegensatz zum Zelloidin besteht bei ihm die intermicellare Flüssigkeit nicht aus einem leicht flüchtigen Medium, sodass bei ihm auf eine stabilere, bei wiederholter Filterbereitung immer wieder leicht herzustellende Porengrösse gerechnet werden kann.

Um uns von der Durchlässigkeit des zu benutzenden Filtermaterials ein Bild machen zu können, wurde zunächst normales Pferdeblutserum durch Agarmembranen verschiedener Porengrösse, ferner durch Zelloidin filtriert und zwar solange, bis die Hälfte des ursprünglichen Serumvolumens durch das «überschichtete» Filter gegangen war. Beistehende Tabelle I giebt über die hierbei erzielten Resultate Aufschluss und zwar die dort eingezeichneten Trockenrückstände über den Gehalt der Filtrate und der Konzentrationssera am festen, zum grössten Teil aus Albumin bestehenden Substanzen, die Glührückstände über den an anorganischen Salzen. Das Trocknen wurde im Vacuum über Schwefelsäure, das Glühen bei starker Rotglut vorgenommen und wurde in allen Fällen solange fortgesetzt, bis Gewichtskonstanz erreicht war. Unter den in Rubrik 3 der Tabelle bei den Filtraten stehenden Bezeichnungen $^{3}/_{10}$ und $^{8}/_{10}$ sind die an dritter bezw. an achter Stelle übergegangenen Fraktionen von je 10 ccm. zu verstehen. Das übrige Filtrat wurde nicht näher untersucht.

Die in der Tabelle enthaltenen Werte zeigen uns zunächst, dass wir in dem Agar ein Filtermaterial besitzen, das geeignet ist, das Bechhold'sche Phänomen recht gut zur Veranschaulichung zu bringen. So sehen wir, dass 1 %iger Agar durchlässiger für die Serumkolloide ist wie 3 %iger, dass ferner die Poren des 3 %igen Agars dem Serumfarbstoff kaum noch den Durchtritt gestatten, während es die des 1 %igen noch thun. Ein Zelloidinfilter wies für Farbstoff und Eiweisskörper noch eine etwas geringere Durchlässigkeit als die 3 %ige Agarmembran auf.

Von weiterem Interesse sind die Ergebnisse der Glührückstandsbestimmung. Sie zeigen, dass die bei den Filtraten erhaltenen

em substancias rezistentes á desecação e ao vermelho rubro (reziduo seco e de incineração), assim como o numero de unidades imunizantes se encontram no quadro II.

Os dados que aí se acham provam que possuimos na ultrafiltração um meio de elevar até trez vezes o valor antitoxico de um soro, evitando o emprego de temperatura de certo modo elevada ou de ajentes quimicos. Infelizmente é ella inutil para a soro-terapeutica, pois com o crecer de unidades imunizantes aumenta proporcionalmente a quantidade de materias albuminoides no soro enriquecido, sendo que, apezar de se conservar o soro completamente claro, elle se torna de consistencia xaropoza, de modo a ser pouco proprio para injeções. Além disso, como mostra o quadro, uma separação de albuminoides por meio de uma membrana de agar mais permeavel é acompanhada de perda aproximadamente equivalente de antitoxina. E' de notar que na filtração de soro antidifterico não se dá a minima *adsorção* dos anticorpos ao material do filtro, quando se compara o numero total de unidades imunizantes contidas no soro primitivo com as que existem no soro concentrado e no filtrado, levando em conta os respetivos volumes, se verifica que a perda de antitoxina é minima.

A questão está limitada a saber si se póde progredir nesse sentido ou não. Nosso parecer seria precoce, dado o numero pequeno de experiencias, e as pesquizas devem ser refeitas com outra orientação por ver si se obterão indicações outras. Porém hoje já podemos dizer que a ultrafiltração só terá evidente importancia para a pratica soroterapica quando se conseguir por meio d'ella separar as materias albuminoides ou, ao menos, a sua maior parte dos anticorpos. Esta idéa será realizada no dia em que se descobrir um material de filtro, que se caraterize, de um lado, por uma capacidade de adsorção para os anticorpos e de outro pela sua solubilidade em temperatura não nociva ao imunicorpo. Com o fim de realizar este pensamento procurámos uzar a gelatina não insolubilizada para material de filtro. Não foram porém as pesquizas conti-

Werte wesentlich geringer sind als die bei dem eingeengten bezw. Originalserum erzielten.

Es leuchtet ohne weiteres ein, dass die Gewichtsfeststellung an und für sich nicht genügt, um die ebenso theoretisch wie praktisch interessante Frage beantworten zu können, ob dieser beim konzentrierten Serum erhaltene Mehrbetrag lediglich auf Rechnung der an das Eiweiss chemisch gebundenen anorganischen Substanzen (Phosphor, Calcium etc.) zu setzen ist, die ja naturgemäss mit der Konzentration des Serums wachsen müssen, oder ob hier auch die Adsorption des Chlornatriums an das eingeengte Serumkolloid eine wesentliche Rolle spielt. Die Beantwortung dieser Frage muss demgemäss späteren, speziell nach dieser Richtung hin vorzunehmenden Untersuchungen vorbehalten bleiben, bei denen es namentlich auf genaue quantitative Bestimmung der anorganischen Salze im Filtrat und Konzentrationsflüssigkeit, insbesondere des Chlornatriums ankommen wird.

Die Filtration des *Diphtherieserums* wurde in derselben Weise wie die des Normalserums bewerkstelligt, nur schützten wir den Apparat vor Tageslicht. Auch hier bedienten wir uns der «überschichteten» Filter. Der Gehalt des Originalserums, des Konzentrationsserums und des Ultrafiltrates an festen bezw. hitzebeständigen Substanzen (Trocken- und Glührückstand) sowie an Immunitätseinheiten findet sich in Tabelle II.

Die dort niedergelegten Daten beweisen, dass wir in der Ultrafiltration ein Mittel besitzen, um den Antitoxingehalt eines Serums bei Vermeidung höherer Wärmegrade und chemischer Agentien bis auf etwa das dreifache zu erhöhen. Leider ist für die serotherapeutische Praxis hierdurch vorläufig noch wenig gewonnen, denn mit dem Wachsen der Immunitätseinheiten nimmt gleichzeitig auch der Eiweissgehalt zu und die Flüssigkeit erreicht schliesslich hierdurch, wenn auch unter Beibehaltung völliger Klarheit, eine derartig stark visköse sirupartige Konsistenz, dass sie für Injektionszwecke ungeeignet wird. Andererseits ist, wie ein Blick auf die Tabelle lehrt, ein bei der Filtration durch dünnporigere Agargallerte erreichbares Eliminieren von Ei-

nuadas, devido á alta temperatura ambiente que impedia se evitasse a fluidificação da membrana de gelatina durante a experiencia. As pesquizas serão agora retomadas e praticadas tambem com outras materias filtrantes.

Literatura

1) MARTIN. Journal of Physiol. Bd. XX, S. 364.

2) H. BECHHOLD. *Die Gallertfiltration.* Kolloid-Zeitschrift, 1907, Bd. 2, S. 3 und 33.

— *Kolloidstudien mit der Filtrationsmethode.* Zeitschr. f. physikal. Chemie. 1907, Bd. 60, S. 259 und 276.

— *Ultrafiltration.* Biochem. Zeitschrift, 1907, S. 379.

3) J. DUCLAUX. *Die Filtration kolloider Lösungen.* Kolloid-Zeitschrift, 1908, Bd. 3, S. 126. (Zugleich enthaltend Literaturangaben über die im Jahre 1904 und später erschienenen Arbeiten von Borrel, Manca und Malfitano).

4) G. GIEMSA und VON PROWAZEK. *Weitere Untersuchungen über sog. ultramikroskopische Infektionserreger. Zur Filtration des Hühnerpestvirus,* Münch. med. Wochenschrift, 1908, Nr. 29.

5) S. v. PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO. *Untersuchungen über die Variola.* Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 44, S. 2265.

weiss auch mit einem Verlust einer annähernd äquivalenten Menge von Antitoxin verbunden. Bemerkenswert ist, dass bei der Filtration des Diphtherieserums eine nennenswerte *Adsorption* der Antikörper durch das Filtermaterial nicht stattfindet, denn vergleicht man die im ursprünglichen unfiltrierten Serum enthaltenen Immunitätseinheiten mit dem der Konzentrationssera bezw. Filtrate unter Berücksichtigung der betreffenden Volumina, so findet man, dass der Verlust an Antikörpern nur ein minimaler ist.

Es drängt sich nun die Frage auf, ob uns die Ultrafiltration überhaupt auf diesem Wege weiterbringen wird. Unserer Ansicht nach wäre es verfrüht, sie auf Grund dieser wenigen Versuche beantworten zu wollen, vielmehr müssen erneute, von anderen Gesichtspunkten ausgehende Experimente weiteres lehren. Soviel aber lässt sich heute schon sagen: von einschneidender Bedeutung für die serotherapeutische Praxis dürfte die Ultrafiltration erst dann werden, wenn es durch sie gelingt, das für die Immunisierung nicht in Betracht kommende Serumeiweiss oder wenigstens den grössten Teil desselben, von den Antikörpern zu trennen. Diese Idee liesse sich vielleicht durch Ausfindigmachen eines Filtermaterials verwirklichen, welches sich einerseits durch grosse Adsorptionsfähigkeit für die Antikörper auszeichnet, andererseits die Eigenschaft besitzt, später wieder bei einer mässigen, die Immunkörper nicht schädigenden Temperatur in Lösung gebracht werden zu können. Von diesem Gedanken ausgehend, versuchten wir zunächst ungehärtete Gelatine als Filtrirmaterial zu verwenden. Leider aber mussten wir die begonnenen Versuche vorläufig wieder abbrechen, da es unmöglich war, bei der z. Zt. hier herrschenden hohen Temperatur die Gelatinemembran während der ganzen Dauer eines Filtrierprozesses vor Verflüssigung zu schützen. Die Versuche sollen jedoch später wieder aufgenommen und auch auf anderes Filtermaterial ausgedehnt werden.

Erephopsis auricincta

Uma nova mutuca, da subfamilia: *Pangoninae*

pelos

Drs. Adolpho Lutz e Arthur Neiva.

(Estampa 1)

Erephopsis auricincta

Eine neue Tabanidenart aus der Subfamilie: *Pangoninae*

von

Dr. Adolpho Lutz und Dr. Arthur Neiva.

(Tafel 1)

Damos em seguida a descrição de uma nova *Pangonina* pertencente ao genero *Erephopsis*, de Rondani, acompanhada de figura em côres, bastante aumentada e que mostra bem as particularidades desta bela especie. (Est. 1).

Erephopsis auricincta n. sp.

Tamanho geral (sem a tromba) 15—16 mm.

Probocida de côr preta, com 6 mm. de comprimento; palpos pardo-ferrujineos; antenas com os dois articulos bazilares enegrecidos, o terceiro ferrujinozo, um pouco enegrecido na baze e no apice; face castanho-escura, quazi sem brilho; fronte e vertice com fundo da mesma côr, o ultimo com pelos pretos curtos e ocelos distintos de brilho amarelado escuro; olhos escuros, com pubecencia enegrecida; barba castanho-escura de reflexos amarelados e arruivados; occiput com a marjem ocular prateada e o resto cinzento com pelos dourados curtos e finos.

Torax, em cima enegrecido, com penujem escura de reflexos dourados e trez estrias lonjitudinais escuras, mais distintas na metade anterior; entre os hombros e os encontros das azas ha pelos mais compridos e completamente escuros; em baixo os pelos têm a côr parecida á da barba; o escutelo é coberto de pelos aveludados, bastante compridos, negros no meio e mais castanhos nas partes laterais.

Wir geben im Folgenden die Beschreibung einer neuen *Pangonine*, die in das Genus *Erephopsis* Rondani gehört, zugleich mit einer ziemlich vergrösserten farbigen Figur, welche die Eigenthümlichkeiten dieser hübschen Art zeigt. (Taf. 1).

Erephopsis auricincta n. sp.

Durchschnittslänge (ohne Rüssel) 15—16 mm.

Rüssel schwarz, 6 mm. lang; Palpen hell rostbraun; Antennen: die beiden Basalglieder schwärzlich, das dritte rostroth und nur an Basis und Spitze etwas schwärzlich; Untergesicht dunkelbraun und fast ohne Glanz; Stirn und Scheitel mit ebenso gefärbtem Grunde, der letztere mit schwarzen Härchen und deutlichen, dunklen Ocellen mit gelblichem Glanze; Augen dunkel, schwärzlich behaart; Bart dunkelbraun mit gelblichem und röthlichem Schimmer; Hinterkopf mit silberglänzendem Augenrande, der Rest grau, mit feinen goldenen Härchen.

Thorax oben schwärzlich mit dunklem, goldschimmerndem Flaum und drei dunklen Längsstreifen, welche in der vorderen Hälfte deutlicher sind; zwischen den Schultern und den Flügelwurzeln sind die Haare länger und ganz dunkel; auf der Unterseite haben sie dieselbe Farbe, wie der Bart; das Schildchen ist mit ziemlich langen sammtartigen Haaren

CASTRO SILVA

Abdomen, em cima, de fundo preto, mostrando na marjem posterior de todos os segmentos pelos finos e brilhantes, á maneira de cintas de côr de ouro; estas, nos segmentos 2, 3, 4 e 5, são bastante alargadas no meio e um pouco menos dos lados; em baixo as cintas são um pouco mais palidas e de largura mais uniforme.

Pernas: *coxae* e *femora* enegrecidos com pubecencia preta, o resto castanho-ferrujinozo bastante claro com pelos amarelados, curtos, sendo apenas a extremidade dos pés um pouco mais escura.

Azas lijeiramente acinzentadas, mais amareladas na rejião da costa, as nervuras de um pardo ferrujinozo, mais declarado na parte amarelada. Primeira celula da marjem posterior e tambem a anal, fechadas um pouco antes da marjem; o ramo anterior da nervura forquilhada em angulo bastante acuzado e ás vezes com apendice brevissimo; balancins castanhos, com a parte apical do capitulo de côr mais clara.

A descrição é fundada no exame de cinco femeas apanhadas em Barbacena (Minas Geraes) no mez de março 1907 pelo Dr. Belisario Penna.

besetzt, welche in der Mitte mehr schwarz und auf den Seiten mehr braun sind.

Abdomen oben mit schwarzem Grunde, der Hinterrand der Segmente mit hellen Härchen besetzt, welche goldfarbige Querbinden bilden, die an den Segmenten 2—5 in der Mitte stark und an den Rändern etwas weniger verbreitert sind; auf der Unterseite sind die Binden heller und von mehr gleichmässiger Breite.

Beine an den Hüften und Schenkeln schwärzlich, mit schwarzem Flaum; der Rest ziemlich hell rostbraun, mit gelblichen Härchen und nur an den Enden der Füsse etwas dunkler.

Flügel leicht graulich, in der Costalregion mehr gelblich; die Adern rostbraun, in den gelben Partien mehr auffallend; erste Hinterrands- und Analzelle etwas vor dem Rande geschlossen; der erste Ast der Gabelader mit deutlich ausgesprochenem Winkel und manchmal mit einem ganz kurzen Anhängsel; Halteren braun, am Ende der Capitula etwas heller.

Es liegen fünf weibliche Exemplare vor, welche von Dr. Belisario Penna im März 1907 in Barbacena (Minas Geraes) gesammelt wurden.

O sôro anti-pestozo

pelo

Dr. Figueiredo Vasconcellos

Chefe de serviço no Instituto

Le sérum anti-pesteux

par le

Dr. Figueiredo Vasconcellos

Chef de service à l'Institut

Em 1900 apareceu pela primeira vez a peste no continente americano, sendo Santos o primeiro porto do Brazil onde fez erupção.

O governo brazileiro justamente alarmado por esse fato cojitou imediatamente de fundar um Instituto onde fosse preparado o sôro anti-pestozo, o que fez, entregando a sua direção tecnica ao dr. Oswaldo Gonçalves Cruz.

Era a incumbencia muito ardua e espinhoza, pois que, ha pouco tempo apenas, havia sido iniciado o tratamento da peste pelo sôro especifico, de modo que nada havia ainda de precizo sobre o seu preparo.

Com efeito, nessa epoca a literatura bacteriolojica pouco rejistrava a esse respeito. Borrel, Calmette e Yersin, que foram os primeiros que tentaram preparar animais pela inoculação de bacilos da peste, com o fim de obter um sôro especifico, nas publicações feitas nos Anaes do Instituto Pasteur, referiam-se apenas de modo geral aos procesos que empregaram. Assim, dizem que inocularam bacilos da peste sob a pele dos animais, mas como obtinham grande numero de abcessos rezolveram fazer a inoculação intra-venoza. Quando chegam á inoculação dos cavalos, para a obtenção de sôro terapeutico, referem-se ao emprego de culturas do bacilo mortas pelo calor, não indicando, porém, as quantidades inoculadas.

En 1900, la peste fit sa première apparition sur le continent américain. Santos fut le premier port du Brésil où elle se déclara.

Justement alarmé, le gouvernement brésilien eut aussitôt l'idée de créer un Institut où l'on préparât le sérum antipesteux. L'Institut fut fondé, et sa direction technique confiée au docteur Oswaldo Gonçalves Cruz.

La mission était bien délicate et difficile. Le sérum spécifique commençait à peine à être employé pour le traitement de la peste, de sorte qu'il n'existait rien de précis sur ce point au sujet duquel la littérature bactériologique était d'une grande pauvreté. Les premiers qui essayèrent de se servir des animaux pour l'inoculation des bacilles de la peste pour obténir un sérum spécifique ont été Borrel, Calmette et Yersin. Ils rapportent d'une façon générale, en des articles publiés dans les Annales de l'Institut Pasteur, qu'ils inoculèrent des bacilles de la peste sous la peau des animaux, mais comme il se produisait un grand nombre d'abcès, ils ont résolu faire l'inoculation intraveineuse. Quant ils arrivent à l'inoculation des chevaux, pour obtenir le sérum thérapeutique, ils nous parlent de l'emploi de cultures de bacilles tués par la chaleur, sans toutefois spécifier les quantités inoculées.

Après quelques essais, le docteur Oswaldo Cruz, forcé par les circonstances, adopta le

Forçado pelas circumstancias e depois de alguns ensaios, o dr. Oswaldo Cruz firmou a seguinte tecnica, que durante muito tempo foi a uzada no Instituto, para o preparo dos cavalos que deveriam fornecer o sôro anti-pestozo.

Uma garrafa de Roux de 20 cm. de comprimento por 11 cm. de largura, contendo geloze simples, apresentando, portanto, o meio nutritivo a superficie de 220 cm.², é semeada com 1 ou 2 cc de cultura em caldo de um bacilo da peste pouco virulento. Conservada na temperatura ambiente e passadas 48 horas a cultura dezenvolvida em superficie, verificada a sua pureza, é emulsionada em 16cc de agua fiziologica a 0.75 %. Recolhida a emulsão é ella esterilizada entre 65 a 68º durante 1 hora. Com esta emulsão esterilizada é que se começava o preparo dos cavalos, que deveriam fornecer o sôro anti-pestozo. Eram estes inoculados intravenozamente com 1, 2, 4, 8, 12 e 16cc dessa emulsão, variando o prazo, em geral de 20 a 30 dias, entre uma e outra das primeiras inoculações, e de um a 2 mezes nas ultimas, conforme a reação que aprezentava o animal. Este só é novamente inoculado depois de ter readquirido seu pezo primitivo. Inoculados os 16cc, isto é, toda a cultura dezenvolvida em uma garrafa, passava-se a fazer a inoculação de culturas vivas, utilizando-se ainda esse mesmo bacilo pouco virulento. Inoculados os 16 cc de emulsão, destes bacilos eram injetados então germens muito virulentos. Nesta serie, porém, principiava-se pela inoculação de 4cc de emulsão, seguidas das de 8, 12 e 16cc. Só então é que o animal considerado suficientemente imunizado começava a fornecer sôro anti-pestozo.

Quer para os bacilos de pouca quer para os de muita virulencia, o modo de preparar a emulsão é sempre o mesmo que já foi descrito, assim como é conservada a já referida série de dózes de inoculação.

O bacilo da peste pouco virulento que empregamos é o mesmo que foi izolado pelo Dr. Oswaldo Cruz, em Santos, em 1900, quando alí foi comissionado pelo Governo Federal para determinar a especie morbida

procédé suivant — lequel fut longtemps employé à l'Institut — pour le traitement des chevaux qui devaient fournir le sérum antipesteux.

Une bouteille de Roux de 20 cm. de long sur 11 de large, contenant de la gélose simple — le milieu nutritif présentant donc une superficie de 220 cm.² — est ensemencé avec 1 ou 2 cc. d'une culture en bouillon d'un bacille de la peste peu virulent. Conservée à la temperature ambiante, au bout de 48 heures, la culture s'est développée en surface; après en avoir vérifié la pureté, on l'émulsionne avec 16 cc. d'eau physiologique à 0,75 %. On recueille l'émulsion et on la stérilise pendant une heure entre 65 et 68º. C'est avec cette émulsion stérilisée que l'on commençait le traitement des chevaux qui devaient fournir le sérum antipesteux: On leur faisait des inoculations intraveineuses, en laissant généralment un intervalle de 20 à 30 jours entre chacune des premières inoculations et d'un à deux mois, pour les dernières, selon la réaction observée chez l'animal, qui n'était inoculé de nouveau, qu'après avoir acquis son poids primitif. Les 16 cc. une fois inoculés (c'est à dire: toute la culture développée dans une bouteille) on passait à faire l'inoculation de bacilles vivants, en employant toujours ce même bacille peu virulent. On inoculait les 16, cc. d'émulsion de ces bacilles, après quoi l'on injectait alors des germes très virulents. Mais dans cette série, on commençait par l'inoculation de 4 cc. de l'émulsion, en passant ensuite à 8, 12 et 16 cc. Ce n'est qu'alors que l'animal était considéré comme suffisament immunisé et commençait à fournir du sérum antipesteux.

Qu'il s'agisse de bacilles peu virulents ou très virulents, la façon de préparer l'émulsion est toujours la même qui vient d'être exposée, bien comme la série de doses à inoculer.

Le bacille de la peste peu virulent, que nous employons est le même qui a été isolé, en 1900 par le Dr. Oswaldo Cruz, à Santos, quand il y fut envoyé en commission par le Gouvernement Fédéral pour déterminer l'espèce morbide qui y régnait alors. On l'inocule tous les six mois dans l'organisme d'un co-

reinante. E' o bacilo passado de 6 em 6 mezes pelo organismo da cobaia, sendo necessario fazer a inoculação intraperitoneal de 2 cc. de uma cultura em caldo, de 48 horas, para se obter a morte do animal.

Os bacilos da peste de forte virulencia são inoculados mensalmente em ratos e cobaias. As nossas culturas da peste são conservadas em geloze simples e na temperatura ambiente.

Pela descrição do processo que acabo de fazer, é facil compreender que o tempo necessario para se obter um cavalo solidamente imunizado, de modo a poder fornecer um bom sôro, é muito longo, não só pelo grande numero de inoculações necessarias, como tambem pelos acidentes que aparecem no decurso do processo imunizante, e que obrigam a distanciar, umas das outras, as inoculações.

Foi por isso modificada a tecnica até então seguida, sendo completamente abolidas as inoculações de culturas mortas.

Eis como procedemos agora: o titulo da emulsão empregada continúa o mesmo $^1/_{16}$, assim tambem a série de dózes de inoculação, variando porém o numero dellas. O animal recebe desde o inicio da imunização inoculações de culturas vivas do bacilo de fraca virulencia, e somente as 3 primeiras dózes da série, isto é, 1, 2 e 4 cc. da emulsão. Passa-se imediatamente a fazer inoculações de culturas vivas dos bacilos de forte virulencia, com estes, então, procede-se á inoculação de toda a série. Quer com um quer com outro bacilo, as inoculações são sempre intravenozas.

Confrontando-se os 2 metodos, vê-se que antigamente era necessario proceder-se a 16 inoculações (6 de cultura morta, 6 de cultura viva de fraca virulencia, e 4 de cultura viva de forte virulencia) para que o cavalo fosse considerado pronto a fornecer o sôro antipestozo, ao passo que hoje ha mister tão somente de 9 inoculações (3 de cultura viva, fraca virulencia e 6 de cultura viva de forte virulencia) para se obter identico rezultado.

O exame dos 2 seguintes quadros mostra claramente o tempo que se ganha com o

baye. Pour obtenir la mort de l'animal, il est nécessaire de faire l'inoculation intrapéritionale de 2 cc. d'une culture en bouillon, de 48 heures.

Les bacilles de la peste de grande virulence, sont inoculés tous les mois à des rats et des cobayes. Nos cultures de peste sont conservées dans la gélose simple et à la température du laboratoire.

Par la discription que je viens de faire du procédé, on comprendra facilement qu'il faille un assez long temps pour obtenir un cheval solidement immunisé et qui puisse fournir un bon sérum. Cela est dû non seulement au grand nombre d'inoculations nécessaires, mais encore aux accidents qui surviennent au cours de l'opération immunisante et qui obligent à espacer les inoculations. Nous avons donc modifié les procédés employés jusqu'alors, en supprimant les inoculations de cultures mortes.

Voici comme nous procédons aujourd'hui:

Le titre de l'émulsion reste toujours le même, $^1/_{16}$, ainsi que la série de doses à inoculer; ce qui varie, c'est le nombre d'inoculations. Dès le debut de l'immunisation, l'animal reçoit des inoculations de cultures vivantes du bacille d'une faible virulence, et seulement les 3 premières doses, c'est à dire 1, 2 et 4 cc. de l'émulsion. On passe aussitôt à faire des inoculations de cultures vivantes des bacilles de forte virulence. Ceux-ci servent à l'inoculation de toute la série. Qu'il s'agisse de l'un ou de l'autre des bacilles, les inoculations sont toujours intraveineuses.

En comparant les deux méthodes, on voit qu'il fallait autrefois procéder à 16 inoculations (6 de culture morte, 6 de culture vivante, de faible virulence et 4 de culture vivante, de forte viruience) pour que le cheval fût considéré prêt à fournir le sérum antipesteux, tandis qu'aujourd'hui il n'en faut plus que 9 (3 de culture vivante, de faible virulence et 6 de culture vivante, de forte virulence) pour arriver au même résultat.

L'examen des deux tableaux suivants montre clairemeut le temps gagné par l'emploi de notre méthode actuelle d'immunisation:

emprego do nosso atual metodo de imunização:

I

PESTE MORTA Germen de fraca virulencia					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVA Germen de fraca virulencia					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVA Germen de forte virulencia			
4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

II

PESTE VIVA Germen de fraca virulencia			
4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVA Germen de forte virulencia					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

Ha quatro anos que é este metodo uzado no preparo dos cavalos fornecedores de sôro anti-pestozo no nosso Instituto, e até hoje só temos a rejistrar um unico cazo de perda do animal. Os cavalos suportam-no perfeitamente, desde que haja prudencia e cuidado com as inoculações. Infelizmente, nem sempre se pode seguir com regularidade o processo imunizante, inoculando-se umas apoz outras, as dózes estabelecidas na serie. Muitas vezes quando se procede á inoculação da dóze imediatamente superior á inoculada, os fenomenos que aprezenta o animal são de tal ordem que manda a prudencia cessar a inoculação, ainda em quantidade menor que a já injetada, para evitar, talvez, a morte do animal.

I

PESTE MORTE Germe de faible virulence					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVANTE Germe de faible virulence					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

PESTE VIVANTE Germe de forte virulence			
4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

II

PESTE VIVANTE Germe de faible virulence		
1 cc.	2 cc.	4 cc.

PESTE VaVANTE Germe de forte virulence					
1 cc.	2 cc.	4 cc.	8 cc.	12 cc.	16 cc.

Voilà quatre ans que cette méthode est employé à notre Institut pour préparer les chevaux destinés à fournir le sérum antipesteux, et jusqu'aujourd'hui nous avons à signaler un seul cas de mort parmi eux. Ils s'en trouvent parfaitement bien pourvu que les inoculations soient faites avec soin et prudence. On ne peut malheuresement employer avec régularité le procédé immunisant, en inoculant l'une après l'autre les doses déterminées dans la série. Et souvent, tandis que l'on procède à l'inoculation de la dose immédiatement supérieure à celle qui vient d'être inoculée, les phenomènes que présente l'animal sont tels que la prudence nous enjoint de cesser l'inoculation, même si la quantité inoculée est inférieure à la précedente, afin d'éviter la mort possible de l'animal.

São imediatas ou mediatas as reações que aprezenta o cavalo depois da inoculação.

As imediatas são constituidas por dispnéa, mais ou menos intensa, tosse, contrações musculares, estado vertijinozo e suores.

A dispnéa é a mais frequente das reações, podendo variar em intensidade, não dependendo isto da quantidade de emulsão inoculada; pois que o mesmo animal pode aprezentar intensa dispnéa com pequena dóze, e quasi nula com dózes mais elevadas. Não tem tambem influencia o gráu de imunização, visto que um animal que já suportou 16 cc de emulsão, póde aprezentar uma dispnéa intensissima com dóze muito inferior a esta.

A tosse acompanha quazi sempre a dispnéa; vem por acessos que se sucedem uns aos outros.

As contrações musculares observam-se nos membros, principalmente nos posteriores. O animal contrae lentamente um dos membros, vendo-se em relevo os musculos contraidos, para depois distendel-o tambem vagarozamente. Estas contrações são alternadas, levantando o cavallo, ora um, ora outro membro posterior. Não é raro observar-se contrações fibrilares nos musculos das coxas e de outras rejiões.

O estado vertijinoso é tambem muito comum: o animal cambaleia, tenta firmar-se d'um lado para imediatamente apoz firmar-se do outro. A's vezes este estado não vae alem disso; em outros cazos, porém, progride de modo que, si se fizer o animal andar, a marcha se torna dificil, não levantando bem os pés e arrastando a parte anterior dos cascos. Si é obrigado a correr, os membros enrijam, batendo uns nos outros durante a corrida, lançando-se o corpo ora para um, ora para o outro lado. Este estado pode adquirir tal intensidade que o animal cae, debatendo-se por levantar-se, o que só consegue com muito esforço.

A's vezes pouco depois da inoculação o animal fica de cabeça baixa, os membros afastados para melhor se conservar em equilibrio, os flancos batem fortemente, intervin-

Les réactions que présente le cheval après l'inoculation sont immédiates ou médiates.

Les immédiates sont les suivantes: dyspnée, plus ou moins forte, toux, contractions musculaires, état vertigineux, sueur.

La plus fréquente d'entre elles est la dyspnée, dont l'intensité peut varier, ce qui ne dépend pas de la quantité d'émulsion inoculée, car l'animal peut souffrir d'une dyspnée intense, avec une petite dose, ou d'une dyspnée presque nulle, avec des doses plus fortes. Le degré d'immunisation n'exerce pas non plus d'influence là-dessus, puisqu'un animal qui a déjà supporté 16 cc. d'émulsion peut être attaqué d'une dyspnée très violente, avec une dose bien inférieure á celle-là.

La toux accompagne presque toujours la dyspnée; elle vient par accès qui se succèdent sans interruption.

On observe les contractions musculaires dans les membres, surtout dans les membres postérieurs. L'animal contracte lentement un des membres — les muscles contractés se dessinent en relief — pour le détendre ensuite avec la même lenteur.

Ces contractions sont alternés; le cheval soulève tantôt l'un tantôt l'autre des membres postérieurs. Il n'est pas rare d'observer des contractions fibrillaires dans les muscles des cuisses et d'autres régions.

L'état vertigineux est aussi très commun: l'animal chancelle, cherche à s'affermir d'un côté pour s'appuyer de l'autre, aussitôt après. Quelquefois, les choses en restent là; mais en d'autres occasions cet état empire, de sorte que, si l'on oblige l'animal à avancer, la marche lui devient difficile: il ne lève pas les pattes et laisse trainer la partie antérieure des sabots. Si on le fait courir, ses membres durcissent; ils se cognent l'un contre l'autre pendant la course, avec des rejets du corps à droite et à gauche. Cet état peut arriver à un tel point d'intensité que l'animal tombe, en se débattant pour tâcher de se relever, ce qu'il n'arrive à faire qu'au prix de grands efforts.

Parfois, peu après, l'animal conserve la tête baissée; il écarte les pattes pour mieux garder l'équilibre, ses flancs halètent avec force et le diaphragme intervient puissamment

do poderozamente para a respiração o diafragma e aprezentam então uma forte crize de suor. Vêm-se aparecer entre os pelos as gotas de suor que se vão reunindo e caindo pelas partes em declive. Em pouco tempo o suor escorre por todo o corpo do animal e o chão, em baixo, mostra grande quantidade de liquido que d'elle cahiu.

As reações mediatas são constituidas pela elevação de temperatura, perda de pezo, tumefação do escroto, e tardiamente as artrites e queda de pelos.

A elevação de temperatura dá-se, em geral, pouco depois da inoculação, podendo a hipertermia atingir 1 a 2.º acima da normal. Passadas 24 horas, porém, comumente é observada a queda, sinão á normal, ao menos ás suas proximidades.

Raro é o cavalo que, 24 horas depois da inoculação não tenha perdido pezo. Geralmente a diminuição é pequena, de 6 a 10 kilos, porém, já observámos, que alguns aprezentavam uma diminuição de 20 a 30 quilos.

A tumefação do escroto é reação não muito rara. Aumentado de volume, a bolsa se torna distendida, tensa e a pele luzidia. Os testiculos aumentam de volume. Na vajinal não se revela a prezença de liquido. Comumente, 48 horas depois tudo desaparece voltando o escroto ao tamanho natural.

As artrites manifestam-se, em geral tardiamente. Localizam-se, geralmente, nas articulações dos membros, podendo porém, aparecer em todas as outras articulações. Já observámos um cavalo que aprezentava artrites, nas articulações da coluna vertebral, mas em outro as artrites apareceram não só nesse ponto como nas articulações de todos os membros. Nestes cazos os animaes se movem muito lentamente, sendo muito dificil voltarem-se, só o podendo fazer quando ha espaço amplo para uma longa curva.

As artrites são no começo acompanhadas de elevação de temperatura, que se prolonga durante alguns dias. Concomitantemente ha grande perda de pezo, pois que o

pour la respiration. Il a alors un fort accès de transpiration. On voit poindre à l'extrémité des poils les gouttes de sueur qui se rejoignent et coulent tout le long du corps. En peu de temps, l'animal est en nage et l'on peut voir sous lui le sol complètement trempé.

Les réactions médiates se font remarquer par l'élévation de la température, la diminution du poids, tuméfaction du scrotum, et, plus tard, l'arthrite et la perte des poils.

La température s'élève, en général, peu après l'inoculation; elle peut arriver à 1 ou 2º au dessus de la normale, mais elle tombe communément au bout de vingt-quatre heures, sinon jus'quà la normale, au moins jusque dans son voisinage.

Il est rare que, vingt-quatre heures après l'inoculation, un cheval n'ait pas perdu de son poids.

La perte n'est généralement pas très grande: de 6 à 10 kilos. Nous en avons cependant observé quelques uns qui accusaient une diminution de 20 à 30 kilos.

La tuméfaction du scrotum est une réaction assez fréquente. L'accroissement de volume produit une tension de la bourse, dont la peau devient luisante et tirée. Les testicules augmentent. L'examen ne rèlève pas la présence de liquide. Tout disparait d'ordinaire au bout de 48 heures, et le scrotum revient à ses proportions normales.

Les arthrites ne se manifestent d'habitude que plus tard. Elles se localisent le plus souvent dans les articulations des membres, mais elles peuvent pourtant apparaître dans toutes les autres. Nous avons déjà observé un cheval qui ne présentait d'arthrites qu'aux articulations de la colonne vertébrale; mais chez un autre, les arthrites étaient apparues non seulement au même endroit mais encore aux articulations de tous les membres. En ce dernier cas, les animaux se meuvent très lentement; ils ne peuvent se retourner qu'avec une grande difficulté, et seulement lorsque l'espace est assez large pour qu'ils puissent faire une grande courbe. La perte des poils accompagne souvent les arthrites.

Celles-ci provoquent, au débout, une élévation de température qui se prolongue pen-

animal pouco come. Conserva-se quazi sempre imovel, de cabeça baixa recuzando a alimentação. Desde, porém, que a temperatura cae e que o processo articular inflamatorio começa a regressar, volta o apetite e o estado do animal melhora, voltando elle rapidamente ao seu primitivo estado.

Muitas vezes as artrites são acompanhadas da queda dos pelos.

Os fenomenos que aparecem logo apóz a inoculação cedem em geral muito rapidamente, e a não ser que assumam proporções assustadoras, nada se deve fazer para combatel-os. Quando, porém, a dispnéa for muito intensa e o estado vertijinozo que em geral a acompanha, fôr grande, deve-se fazer o animal caminhar, e, até si possivel for, correr, com o que tudo cederá. Si apezar disso, o estado do cavalo não melhorar, serão lançados baldes de agua fria sobre a cabeça do animal; si com isso ainda não fôr obtido o rezultado dezejado e continuarem os sintomas alarmantes e que o animal venha a cair, ficando prostrado, a frição de todo o torax com escovas grossas, derramando-se alcool sobre as partes fricionadas fará em breve reanimar o animal, cujo estado melhorará pouco a pouco, até o dezaparecimento completo de todos esses sintomas.

As manifestações tardias não reclamam intervenção alguma, cessando com o repouzo e o tempo. Dellas só tem importancia as artrites. Deve-se tomar cuidado extraordinario, com a nova inoculação que se tiver de fazer no animal que as tenha aprezentado. Só deverá ser feita depois que o mesmo estiver completamente restabelecido, tendo readquirido o pezo primitivo. A dóze de inoculação não deve ser aumentada, e sim egual á que já tiver sido injetada. Assim procedendo, muito provavelmente, nada sofrerá com a inoculação.

No preparo do sôro anti-pestozo é de grande importancia o sequestro do animal durante o tempo em que perdura na circulação o germen da peste inoculado. E isto se torna principalmente questão capital nos paizes tropicaes, como o nosso, em que ha grande numero de insetos sugadores.

dant plusieurs jours. Le poids de l'animal diminue aussi sensiblement, puisqu'il mange peu. Il reste presque toujours immobile, la tête basse, refusant toute nourriture. Mais, dès que la température s'abaisse et que le procéssus articulaire inflammatoire commence à diminuer l'appétit revient, l'état de l'animal s'améliore et il recouvre bientôt sa vigueur première.

Les phénomènes qu'on observe aussitôt après l'inoculation, disparaisent en général très vite, et sauf les cas où ils prennent un caractère sérieux, on ne doit rien faire pour les combattre. Si cependant la dyspnée est très intense et l'état vertigineux, qui l'accompagne la plupart du temps, est vif, il faut faire marcher l'animal; le faire même courir, si possible, et les symptomes cederont. Si malgré tout, l'état de l'animal ne se modifie pas, on lui jettera de l'eau sur la tête; si ce traitement ne produit pas d'effet, que les symptomes alarmants continuent à se manifester et que l'animal vienne à tomber et reste couché sur le sol, on le ranimera en lui frictionnant le thorax avec de grosses brosses et en versant de l'alcool sur les parties frictionnées. Il se remettra peu à peu, jusqu'à la disparition totale de tous ces symptomes.

Les manifestations qui ne se produisent qu'au bout d'un certain temps n'exigent aucune intervention. Le temps et le repos se chargent de les faire cesser. Seules les arthrites ont, alors une assez grande importance, et il faut prendre bien garde à la nouvelle inoculation faite à l'animal qui en est attaqué. Elle ne devra être faite qu'après son complet rétablissement, lors'qu'il aura acquis son poids primitif. La dose à inoculer ne devra pas être augmentée; elle sera identique à la précedente. En agissant ainsi, l'animal n'aura très probablement rien à craindre de l'inoculation.

Dans la préparation du sérum antipesteux, il convient — et c'est là un point capital — d'isoler l'animal tous le temps que le germe de la peste inoculé circule en son corps. C'est là une chose de très grande importance, surtous dans les pays tropicaux, come le notre, où il existe un grand nombre d'insects suceurs.

Com o fim de determinar o prazo em que devia permanecer izolado o animal apoz a inoculação, fizemos, auxiliado pelo nosso companheiro de trabalho Antonio Cardoso Fontes, uma serie de experiencias com o fim de verificar durante quanto tempo se mantinham vivos no sangue do cavalo os bacilos da peste inoculados.

Nas nossas experiencias uzámos sempre da seguinte tecnica: inoculado o cavalo eram retirados, ao fim do tempo dezejado, da veia jugular oposta áquella em que fora feita a inoculação, certa quantidade de sangue que era imediatamente semeada em caldo. O sangue era colhido diretamente da veia, sendo esta puncionada pela agulha, montada em seringa comum, atravessando-se todas as camadas superpostas á veia. A rejião puncionada era previamente raspada á navalha, dezinfetada com solução de sublimado a $^1/_{1000}$, lavada em seguida com alcool absoluto e depois com eter.

Com estes cuidados, ou obtinhamos constantemente culturas puras, ou o meio se conservava esteril. Recolhiamos, geralmente, 5 cc. de sangue que eram semeiados em 100 cc. de caldo simples, mas nas colheitas feitas 24 horas depois da inoculação eram recolhidos 20 cc. de sangue os quais eram semeados em 500 cc. de caldo.

Estes estudos foram feitos em cavalos que já estavam imunizados ou em via de imunização.

Os seguintes quadros dão em minucia os rezultados obtidos:

Afin de déterminer le temps pendant lequel l'animal doit être isolé, aprés l'inoculation, nous avons fait, avec l'aide de notre confrère Antonio Cardoso Fontes, une série d'experiences en vue de vérifier pendant combien de temps les bacilles de la peste inoculés se conservent vivants dans le sang du chaval. Dans nos expériences, nous avons toujours procédé comme suit: Une fois le cheval inoculé et au bout du temps nécessaire, nous prelevyions de la veine jugulaire opposée à celle où l'inoculation avait été faite, une certaine quantité de sang qui était aussitôt ensemencé dans du bouillon. Le sang était directement recueilli de la veine que l'on ponctionnait au moyen d'une aiguille montée sur une seringue ordinaire, qui traversait toutes les couches de tissus situés au dessus de la veine. La région ponctionnée était d'abord rasée, puis désinfectée avec une solution de sublimé à $^1/_{1000}$ et lavée avec de l'acool pur et, ensuite, de l'éther.

Avec ces précautions, nous obtenions régulièrement des cultures pures ou bien le milieu se conservait stérile. Nous recueillions en général 5 cc. de sang que nous semions ensuite dans 100 cc. de bouillon simple; mais si le sang était prélevé dans les 24 heures qui suivaient l'opération, nous en obtenions 20 cc., que nous semions dans 500 cc. de bouillon.

Ces expériences ont été faites sur des chevaux qui étaient déjà immunisés ou en voie d'immunisation.

Les tableaux suivants donnent une idée détaillée des résultats obtenus:

Cheval 1

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
1 cc	f	5 cc	1	100 cc	. . .	+
2 cc	f	5 cc	5	100 cc	. . .	+
8 cc	f	5 cc	6	100 cc	. . .	+
»	»	»	7	»	. . .	+
»	»	20 cc	27	500 cc	. . .	—
12 cc	f	5 cc	14	100 cc	. . .	+
»	»	»	15	»	. . .	+
»	»	»	16	»	. . .	+
16 cc	f	5 cc	22	100 cc	. . .	+
»	»	»	24	»	. . .	+
»	»	»	26	»	. . .	+
4 cc	F	5 cc	8	100 cc	39°.7	+
»	»	»	10	»	39°.9	+
»	»	»	12	»	39°.9	+
5 cc	F	5 cc	17	100 cc	39°.8	+
»	»	»	19	»	39°.4	+
»	»	»	21	»	39°.6	+
»	»	20 cc	24	500 cc	39°.6	+
8 cc	F	5 cc	17	100 cc	37°.8	+
»	»	»	19	»	37°.4	+
»	»	20 cc	21	500 cc	37°.8	—
»	»	»	24	»	38°.2	—
8 cc	F	5 cc	20	100 cc	39°.5	—
»	»	»	22	»	38°.5	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.8	+

Legende:

F - germes de forte virulence. + il y a eu de culture. S - sang.
f - germes de faible virulence. — il n'y a pas eu de culture. H - heures.

Cheval 2

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
16 cc	F	20 cc	24	500 cc	38.5	+

Cheval 5

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
12 cc	F	5 cc	18	100 cc	. . .	+
»	»	»	21	»	. . .	+
»	»	20 cc	24	500 cc	. . .	—
12 cc	F	5 cc	20	100 cc	40°.0	+
»	»	»	22	»	40°.2	+
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.0	+
»	»	»	26	»	40°.0	+
16 cc	F	5 cc	20	100 cc	38°.2	+
»	»	»	22	»	38°.2	+
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.4	+
16 cc	F	5 cc	17	100 cc	39°.2	+
»	»	»	19	»	38°.4	+
»	»	»	21	»	38°.2	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.5	+

Cheval 8

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Resultat	Temp.	Resultat
14 cc	F	5 cc	17	100 cc	39°.6	+
»	»	»	19	»	38°.6	+
»	»	»	21	»	38°.0	+
»	»	20 cc	24	500 cc	39°.2	—
16 cc	F	5 cc	15	100 cc	39°.4	—
»	»	»	17	»	38°.9	—
»	»	»	19	»	39°.2	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.4	—

Cheval 9

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
16 cc	F	5 cc	14	100 cc	. . .	—
»	»	»	16	»	. . .	—
»	»	»	18	»	. . .	—
»	»	»	20	»	. . .	—
8 cc	F	5 cc	7	100 cc	40°.2	+
»	»	»	10	»	40°.0	—
10 cc	F	5 cc	7	100 cc	40°.2	+
»	»	»	8	»	40°.0	+
»	»	»	9	»	39°.9	+
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.6	+
16 cc	F	5 cc	18	100 cc	38°.2	—
»	»	»	20	»	38°.0	—
»	»	20 cc	22	500 cc	39°.0	—

Cheval 11

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
16 cc	f	5 cc	20	100 cc	. . .	—
»	»	»	22	»	. . .	—
»	»	20 cc	24	500 cc	. . .	—
16 cc	f	5 cc	9	100 cc	. . .	+
»	»	»	11	»	. . .	+
»	»	»	13	»	. . .	+

Cheval 12

Emulsion $^1/_{16}$	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
4 cc	f	5 cc	1	100 cc	. . .	+
»	»	»	2	»	. . .	+
12 cc	f	5 cc	3	100 cc	. . .	+
»	»	»	4	»	. . .	+
16 cc	f	5 cc	10	100 cc	. . .	+
»	»	»	11	»	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	+
4 cc	F	5 cc	10	100 cc	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	+
»	»	»	14	»	. . .	+
»	»	»	16	»	. . .	+
8 cc	F	5 cc	15	100 cc	38°.5	—
»	»	»	17	»	38°.0	—
»	»	»	19	»	38°.0	—
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.1	—
12 cc	F	5 cc	17	100 cc	37°.6	—
»	»	»	19	»	37°.6	—
»	»	20 cc	24	500 cc	37°.6	—
12 cc	F	5 cc	18	100 cc	39°.2	+
»	»	»	20	»	39°.0	+
»	»	20 cc	24	500 cc	39°.2	+
»	»	»	48	»	40°.2	+

Cheval 14

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
1 cc	f	5 cc	15	100 cc	. . .	+
»	»	»	30	»	. . .	+
»	»	»	45	»	. . .	+
»	»	»	1	»	. . .	+
2 cc	f	5 cc	2	100 cc	. . .	+
»	»	»	4	»	. . .	+
»	»	»	6	»	. . .	+
»	»	»	8	»	. . .	+
4 cc	f	5 cc	8	100 cc	. . .	+
»	»	»	10	»	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	—
»	»	»	14	»	. . .	—
8 cc	f	5 cc	10	100 cc	. . .	+
»	»	»	12	»	. . .	+
»	»	»	14	»	. . .	—
»	»	»	16	»	. . .	—
10 cc	f	5 cc	15	100 cc	40°.2	+
»	»	»	17	»	40°.2	+
»	»	»	19	»	40°.2	—
»	»	»	21	»	40°.6	

Cheval 14

Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	H. après	Bouillon	Temp.	Resultat
12 cc	f	5 cc	17	100 cc	39°.8	—
»	»	»	19	»	39°.0	—
»	»	»	21	»	39°.6	—
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.0	—
16 cc	f	5 cc	18	100 cc	39°.9	—
»	»	»	20	»	39°.4	—
»	»	»	22	»	40°.2	—
»	»	20 cc	24	500 cc	40°.2	+
4cc	F	5 cc	6	100 cc	40°.0	—
»	»	»	8	»	39°.0	—
»	»	»	10	»	38°.4	—
»	»	20 cc	24	500 cc	37°.8	—
4 cc	F	5 cc	5	100 cc	40°.2	+
»	»	»	7	»	39°.6	+
»	»	»	9	»	39°.2	+
»	»	20 cc	24	500 cc	38°.5	—
8 cc	F	5 cc	16	100 cc	39°.6	+
»	»	»	18	»	38°.8	+
»	»	20 cc	20	500 cc	40°.0	+

Resultat des ensemencements effectués 24 hs. après l'inoculation

Chéval	Emulsion 1/16	Virulence	S. récueilli	Bouillon	Temp.	Résultat	RESUMÉ
14	4 cc	F	20 cc	500 cc	37°.8	—	*Jusqu'à 10 cc*
14	»	»	»	»	38°.5	—	T. au d. normale { cult. . . 3 steril. . . 0
1	5 cc	F	20 cc	500 cc	39°.6	+	
1	8 cc	»	»	»	38°.2	—	T. normale . . . { cult. . . 0 steril. . . 4
1	»	»	»	»	38°.8	+	
1	»	f	5 cc	100 cc	. . .	—	
12	8 cc	F	5 cc	100 cc	38°.1	—	*De 10 à 16 cc*
9	10 cc	F	20 cc	500 cc	40°.6	+	T. au d. normale { cult. . . 3 steril. . . 0
5	12 cc	F	5 cc	100 cc	. . .	—	
5	»	»	»	»	40°.0	+	T. normale . . . { cult. . . 0 steril. . . 1
12	12 cc	F	20 cc	500 cc	37°.6	—	
12	»	»	»	»	39°.2	+	
14	12 cc	f	20 cc	500 cc	40°.0	—	*De 16 cc*
8	14 cc	F	20 cc	500 cc	36°.2	—	T. au d. normale { cult. . . 1 steril. . . 0
2	16 cc	F	20 cc	500 cc	38°.5	+	
5	16 cc	F	20 cc	500 cc	38°.4	+	T. normale . . . { cult. . . 3 steril. . . 1
5	»	»	»	»	38°.5	+	
8	16 cc	F	20 cc	500 cc	38°.4	—	
11	16 cc	f	20 cc	500 cc	. . .	—	
14	16 cc	f	20 cc	500 cc	40°.2	+	

Legende:

F - germes de forte virulence. — il n'y a pas eu de culture. S - sang.
f - germes de faible virulence. + il y a eu de culture.

O caldo que servia para a sementeira era contido em matrazes de fundo chato, de modo que o sangue semeado se depozitava em camada delgada sobre o fundo. Quando havia dezenvolvimento de cultura, as colonias aprezentavam-se de dois modos: ou apareciam como pontos brancos, em fundo vermelho, constituido pelo sangue, e que iam aumentando pouco a pouco, tendo em torno uma zona enegrecida, ou ficavam suspensas no meio da massa liquida. Nestes condições, as colonias ficavam suspensas, como pontos brancos arredondados.

As colonias eram sempre transplantadas para geloze. Dellas eram feitos dois preparados, córando-se um pela tionina e outro pelo metodo de Gram. Com a cultura obtida eram inoculados ratos e cobaias. Eram assim identificados os germens obtidos nas culturas.

Os bacilos obtidos nas culturas conservavam a mesma virulencia que os inoculados.

Dos nossos estudos tiramos as seguintes conclusões:

Le bouillon qui servait à l'ensemencement était contenu dans des fioles à fond plat, de sorte que le sang semé se déposait au fond, en couche mince. Lorsqu'il y avait un développement de culture, les colonies se présentaient sous deux aspects: tantôt elles apparaissaient comme un point blanc sur le fond rouge du sang; ce point augmentait peu à peu avec, tout autour, une région noirâtre, tantôt elles restaient suspendues au sein de la masse liquide. En se dernier cas, elles apparaissaient comme des points blancs arrondis.

Les colonies étaient toujours repiquées dans de la gélose. On en faisait deux préparations, en en colorant une avec de la thionine et l'autre par la méthode de Gram. La culture obtenue servait à inoculer des rats et des cobayes. On identifiait ainsi les germes obtenus dans les cultures.

Les bacilles obtenus dans les cultures conservaient la même virulence que les bacilles inoculés.

Em relação á permanencia do bacilo da peste no sangue do cavalo inoculado é indifferente o fator dóze, pois que, muitas vezes, apezar da inoculação de pequena quantidade os germens perzistem vivos durante muito tempo, emquanto que, apoz a inoculação de dózes maiores dezaparecem em prazo relativamente curto.

A persistencia durante 24 horas é muito comum.

A temperatura do animal não dá indicação exata da existencia ou não de bacilos da peste no sangue.

Animais cuja temperatura era normal 24 horas depois da inoculação, ainda aprezentavam em 20 cc. de sangue germens cultivaveis.

Animais cuja temperatura ainda era elevada 24 horas depois da inoculação, não mais aprezentavam em 20 cc. de sangue germens cultivaveis.

Na maioria das vezes, porém, desde que a temperatura esteja normal não ha mais germens cultivaveis.

E' pequeno o prazo de 24 horas para que seja retirado do izolamento em que se acha o cavalo que tiver sido inoculado com bacilos da peste.

Passadas 48 horas depois da inoculação, desde que a temperatura do cavalo seja normal, não ha mais bacilos da peste vivos no sangue do animal inoculado.

Nos études nous ont amenés aux conclusions suivantes:

Au point de vue de la permanence du bacille de la peste dans le sang du cheval inoculé, le facteur dose est indifférent, car, souvent, malgré l'inoculation d'une faible quantité, les germes restent longtemps en vie, au lieu que, après l'inoculation de doses plus fortes, ils disparaissaient dans un délai relativement court.

La persistance pendant 24 heures est très commune.

La température de l'animal ne révèle pas exactement s'il existe ou non des bacilles de la peste.

Des animaux dont la température etait normale 24 heures après l'inoculation présentaient encore, dans 20cc. de sang, des germes cultivables.

Des animaux dont la température etait encore haute 24 heures après l'inoculation ne présentaient plus, dans 20 cc. de sang de germes cultivables.

Toutefois, dans la plupart des cas, dès que la température etait normale, il n'y avait plus de germes cultivables.

Le délai de 24 heures est court pour retirer de l'isolement un cheval qui aura été inoculé avec des bacilles de la peste.

48 heures après l'inoculation, dès que la température du cheval est normale, il n'y a plus de bacilles de la peste dans le sang de l'animal inoculé.

Contribuições para o conhecimento da fauna indijena de Tabanidas

pelos

Drs. Adolpho Lutz e A. Neiva.

Beiträge zur Kentniss der einheimischen Tabanidenfauna

von

Dr. Adolpho Lutz e Dr. A. Neiva.

No Instituto de Manguinhos existe uma coleção de Tabánidas que pela sua maior parte consiste de especies apanhadas no Xerém por um de nós e pelo dr. Ruy Ladisláo. Contem assim principalmente fórmas dos arrabaldes do Rio de Janeiro das quais mais abaixo se dará uma lista. Quazi todas estas especies foram já encontradas em outros lugares onde as condições são semelhantes. Como mais raros póde-se mencionar a *Diatomineura exeuns* Walker e o *Tabanus aphanopterus* Wied., dos quais conhecemos a primeira de Petropolis e o segundo dos arrabaldes de S. Paulo. O aparecimento do *Tabanus importunus* Wied. no territorio do Rio de Janeiro tem interesse especial porque esta especie, comum ao Norte (Norte de Goyaz, Maranhão e Pará), parece encontrar aqui os limites meridionais do seu territorio; o mesmo se póde prezumir do *Tabanus marginatus* Macq. (*macroceratus* Bigot), fórma quazi esquecida, que se não encontra nos muzeus europeus. Foram apanhados trez exemplares em Xerém nos mezes de Fevereiro, Março e Abril. (Recentemente obtivemos 3 femeas desta especie de Ubatuba e de Sabaúna no Estado de S. Paulo e de Itaguahy no Estado do Rio de Janeiro.)

Na coleção acham-se tambem umas mutucas colhidas em Barbacena (Minas Geraes)

In dem «Instituto de Manguinhos» befindet sich eine Sammlung von Tabaniden, die zum grösseren Teile in Xerém von einem von uns und Dr. Ruy Ladisláo zusammengebracht wurde. Dieselbe enthält demgemäss hauptsächlich Formen aus der Umgegend von Rio, von denen weiter unten ein Verzeichniss gegeben werden soll. Es handelt sich fast durchwegs um Arten, die auch anderswo unter ähnlichen Verhältnissen beobachtet worden sind. Als etwas seltener wären *Diatomineura exeuns* Walker und *Tabanus aphanopterus* Wied. anzuführen, erstere uns schon von Petropolis, letztere aus der Umgegend von S. Paulo bekannt. Besonders interessant ist aber das Vorkommen von *Tabanus importunus* Wied. im Gebiete von Rio de Janeiro, der zwar im Norden (Nord-Goyaz, Maranhão und Pará) gemein ist, hier aber bereits an der südlichen Grenze seiner Verbreitung angelangt sein dürfte. Dasselbe gilt auch von *Tabanus marginatus* Macq. (*macroceratus* Bigot), einer ganz verschollenen Form, die in europäischen Museen kaum zu finden ist. Es wurden in Xerém drei Exemplare in den Monaten Februar, März und April erbeutet. (Neuerdings erhielten wir drei Weibchen dieser Art von Ubatuba und Sabaúna im Staat S. Paulo und Itaguahy im Staat Rio de Janeiro.)

In der Sammlung befinden sich ausserdem

pelo dr. Belisario Penna, entre as quais ha duas especies novas de *Erephopsis (Pangoninae)* que descreveremos com os nomes de *auricincta* e *nubiapex.*

Ha pouco tempo a coleção recebeu uma contribuição importante constituida por cerca de 200 Tabánidas, colecionados pelos drs. Fernando Soledade e Mauricio de Abreu no Estado de Minas, entre Theophilo Ottoni e as marjens do Rio Doce. E' esta zona coberta de mata virgem continua e a sua altura acima do nivel do mar varia de 160 a 300 metros; em relação á fauna de dipteros póde ser considerada terreno ainda completamente inexplorado.

Podia-se prever o aparecimento de especies novas porque a zona é situada bastante para o norte do Rio de Janeiro, cuja fauna, assim como a do Amazonas, é das mais conhecidas. Desta ultima havia que esperar já algumas especies; de outro lado, podia-se contar com outras, anteriormente descritas do Brazil sem mais indicação e que depois não foram mais encontradas, e principalmente com umas especies inteiramente novas, visto que entre as poucas mutucas procedentes do mesmo estado já achamos varias novidades. Esta esperança se realizou; encontrámos de especies novas uma *Erephopsis,* uma *Esenbeckia* e algumas especies de *Tabanus* maiores e menores, e finalmente mutucas que já tinhamos do Pará e de outros lugares, mas que não haviam sido descritas ainda. Mais abaixo daremos um catalogo das especies.

Finalmente o Instituto tambem recebeu algumas mutucas do Estado de Matto Grosso trazidas pelo farmaceutico Cesar Diogo Filho. Ao lado de algumas *Lepidoselaga lepidota* Wied. e de dois exemplares de especie vizinha ao *Tabanus comitans* Wied., foi encontrado um *Diachlorus* que não combina com qualquer das especies descritas como *Diachlorus,* mas sim com o *Chrysops bipunctatus* Wied.

Damos aqui a lista dos Tabánidas colecionados no Estado do Espirito Santo. Os exemplares com poucas exceções eram bastante, alguns até muito bem conservados; eram todos femeas.

einige von Dr. Belisario Penna in Barbacena (Minas Geraes) gesammelte Tabaniden und darunter zwei neue *Erephopsisarten (Pangoninae),* die wir als *E. auricincta* und *nubiapex* beschreiben werden.

Vor Kurzem erhielt die Sammlung einen wichtigen Beitrag in der Form von circa 200 Tabaniden, welche von den Drs. Fernando Soledade und Mauricio de Abreu im Staate Espirito Santo, zwischen Theophilo Ottoni und dem Rio Doce gesammelt wurden. Diese Zone ist von zusammenhängendem Urwald bedeckt und wechselt in ihrer Höhe über dem Meeresspiegel zwischen 160 und 300 Meter; in Beziehung auf ihre Dipterenfauna kann sie als völlig unerforschtes Terrain gelten.

Man konnte voraussehen, dass neue Arten auftreten würden, da diese Zone ziemlich nördlich von Rio de Janeiro liegt, dessen Fauna, neben der des Amazonengebietes, am besten bekannt ist. Aus letzterem liess sich eine Anzahl von Arten erwarten, aber andererseits konnte man auch auf solche hoffen, die ohne Ortsangabe früher aus Brasilien beschrieben und seither nicht mehr gefunden wurden, ganz besonders aber auch auf ganz neue Arten, da unter den wenigen, im selben Staate gesammelten Tabaniden verschiedene Novitäten vorkommen. Diese Erwartung hat sich erfüllt; wir fanden von neuen Arten eine *Erephopsis*, eine *Esenbeckia* und einige grössere und kleinere Tabanusarten, ausserdem auch Arten, die wir von Pará und anderen Orten besassen, die aber noch nicht beschrieben sind. Weiter unten geben wir einen Katalog der Arten.

Endlich erhielt das Institut auch einige vom Apotheker Cesar Diogo Filho mitgebrachte Bremsen aus dem Staate Matto Grosso. Neben einigen *Lepidoselaga lepidota* Wied. und zwei Exemplaren einer dem *T. comitans* Wied. nahestehenden Arten fand sich auch ein *Diachlorus*, der mit keiner der beschriebenen Arten übereinstimmte, wohl aber mit dem *Chrysops bipunctatus* Wied.

Wir geben hier die Liste der im Staate Espirito Santo gesammelten Tabaniden; die Exemplare waren mit wenigen Ausnahmen genügend, teilweise sogar sehr gut erhalten. Es waren lauter Weibchen.

Lista das especies de Tabánidas colecionados no Estado de Espirito Santo:

1.	Lepidoselaga lepidota Wied.	34
2.	Tabanus miles Wied.	32
3.	» macroceratus Bigot.	21
4.	*Esenbeckia neglecta* n. sp.	15
5.	Tabanus modestus Wied.	11
6.	Diachlorus bivittatus Fabr.	11
7.	Tabanus taeniotes Wied.	8
8.	Dichelacera alcicornis Wied.	6
9.	Tabanus fuscus Wied.	6
10.	Dichelacera januarii Wied.	5
11.	Tabanus quadripunctatus Fabr.	5
12.	» vestitus Wied.	5
13.	» *nigristrigma* n. sp.	5
14.	» leucaspis Wied.	4
15.	» guttipennis Wied.	3
16.	» *subniger* n. sp.	3
17.	*Erephopsis soledadei* n. sp.	3
18.	Tabanus unicolor Wied.	2
19.	» *scriptipennis* n. sp.	2
20.	Erephopsis sorbens Wied.	2
21.	Chrysops laetus Wied.	2
22.	Acanthocera longicornis Fabr.	2
23.	Tabanus triangulum Wied.	2
24.	Esenbeckia bahiana Bigot.	1
25.	Erephopsis tabanipennis Macq.	1
26.	*Tabanus imitator* n. sp.	1
27.	» aurora Macq.	1
28.	» sorbillans Wied.	1
29.	» mexicanus L.	1
30.	» fuscipennis Wied.	1
31.	» cinereus Wied.	1
32.	» *anonymus* n. sp.	1
33.	Chrysops costatus Fabr.	1
34.	» molestus Wied.	1
35.	Tabanus limpidapex Wied.	1
	Total	201

Lepidoselaga lepidota Wied. é especie commum nas partes mais quentes do Brazil, mórmente nos Estados situados para o nórte do tropico. O mesmo se póde dizer do *Tabanus modestus, T. triangulum* e *Chrysops laetus,* achando-se o *T. leucaspis* na mesma zona, porém mais raramente; um de nós encontrou todas estas especies no Estado de S. Paulo, como no do Pará. O *T. unicolor* tem a mesma distribuição e parece tor-

Verzeichniss der im Staate Espirito Santo gesammelten Tabaniden:

1.	Lepidoselaga lepidota Wied.	34
2.	Tabanus miles Wied.	32
3.	» macroceratus Bigot.	21
4.	*Esenbeckia neglecta* n. sp.	15
5.	Tabanus modestus Wied.	11
6.	Diachlorus bivittatus Fabr.	11
7.	Tabanus taeniotes Wied.	8
8.	Dichelacera alcicornis Wied.	6
9.	Tabanus fuscus Wied.	6
10.	Dichelacera januarii Wied.	5
11.	Tabanus quadripunctatus Fabr.	5
12.	» vestitus Wied.	5
13.	» *nigristigma* n. sp.	5
14.	» leucaspis Wied.	4
15.	» guttipennis Wied.	3
16.	» *subniger* n. sp.	3
17.	*Erephopsis soledadei* n. sp.	3
18.	Tabanus unicolor Wied.	2
19.	» *scriptipennis* n. sp.	2
20.	Erephopsis sorbens Wied.	2
21.	Chrysops laetus Wied.	2
22.	Acanthocera longicornis Fabr.	2
23.	Tabanus triangulum Wied.	2
24.	Esenbeckia bahiana Bigot.	1
25.	Erephopsis tabanipennis Macq.	1
26.	*Tabanus imitator* n. sp.	1
27.	» aurora Macq.	1
28.	» sorbillans Wied.	1
29.	» mexicanus L.	1
30.	» fuscipennis Wied.	1
31.	» cinereus Wied.	1
32.	» *anonymus* n. sp.	1
33.	Chrysops costatus Fabr.	1
34.	» molestus Wied.	1
35.	Tabanus limpidapex Wied.	1
	Total	201

Lepidoselaga lepidota Wied. ist eine in den wärmeren Teilen Brasiliens, besonders in den nördlich vom Wendekreis gelegenen Staaten, gemeine Art. Dasselbe kann man von *Tabanus modestus, T. triangulum* und *Chrysops laetus* sagen, während *Tabanus leucaspis* eben daselbst, aber seltener vorkommt. Einer von uns fand diese Arten sowohl im Staate S. Paulo, als in demjenigen von Pará. Der *Tabanus unicolor* hat dieselbe Verbreitung und

nar-se mais frequente em direção ao Norte, mas como elle prefere o crepusculo (e isto acontece tambem com o *T. mexicanus*), é só possivel apanhal-o em certas horas. *T. mexicanus, T. quadripuntactus* e *C. costatus* têm distribuição ainda mais vasta e são especies comuns.

O interesse principal cabe ás especies que até hoje só conhecemos dos Estados de S. Paulo e Rio de Janeiro e dos lugares mais vizinhos como o *T. taeniotes, Dichelacera alcicornis, D. januarii, T. guttipennis, Erephopsis tabanipennis, T. aurora, T. fuscipennis, Erephopsis sorbens* de um lado e aquelles do outro lado que só eram conhecidos do Nórte, como o *T. vestitus* Wied. e o *T. cinereus* e *Esenbeckia bahiana*, descritos de exemplares colhidos na Bahia. O *Diachlorus bivittatus* até hoje só se conhecia dos arrabaldes do Rio, emquanto que o *T. fuscipennis* e *T. limpidapex* se encontram, tanto aqui como nas serras de S. Paulo.

Restam ainda algumas especies que parecem ter o principal centro de distribuição no Estado de Minas e entre ellas algumas novas. Conhecemos o *T. miles* de Petropolis e do Estado de Goyaz; o *T. macroceratus* até ha pouco só se conhecia do Xerém, onde todavia é raro. O grande numero de exemplares (21) existentes na coleção mostra que é frequente naquella zona. Na mesma se encontra outra especie semelhante, porém nova, o *T. nigristigma.* Outras especies novas são *Esenbeckia neglecta,* que lembra a *Esenbeckia fasciata,* uma *Erephopsis (soledadei),* que se parece com a *nigricans* n. sp. do Estado de Espirito Santo; finalmente algumas especies menores em parte vizinhas ao *T. tæniotes.*

scheint nach dem Norden zu immer häufiger zu werden; weil er aber, ebenso wie *Tabanus mexicanus,* die Dämmerung liebt, wird er gewöhnlich nur zu bestimmten Stunden gefangen. *T. mexicanus, T. quadripunctatus* und *Ch. costatus* haben ein noch weiteres Verbreitungsgebiet und sind gemeine Arten.

Das Hauptinteresse liegt in solchen Arten, welche wir bisher nur aus den Staaten São Paulo und Rio de Janeiro oder deren nächsten Nachbarschaft kannten, wie *T. taeniotes, Dichelacera alcicornis, D. januarii, T. guttipennis, Erephopsis tabanipennis, T. aurora, T. fuscipennis, Erephopsis sorbens* einerseits und andererseits denjenigen, die nur ganz aus dem Norden bekannt waren, wie *T. vestitus* Wied. und den aus Bahia beschriebenen *T. cinereus* und *Esenbeckia bahiana. Diachlorus bivittatus* war bisher nur aus der Gegend von Rio bekannt, während *T. fuscipennis* und *T. limpidapex* ebendaselbst und in den Bergketten von S. Paulo vorkommen.

Es bleiben noch einige Arten, die in Minas ihr Hauptverbreitungscentrum zu haben scheinen, worunter auch einige neue. *T. miles* kennen wir von Petropolis und dem Staate Goyaz, während für *T. macroceratus* bis vor kurzem nur Xerém (Staat Rio) als Fundort bekannt war, woselbst er aber selten ist. Dagegen ersieht man aus der grossen Zahl der Exemplare (21) der Sammlung, dass er in jener Zone häufig vorkommt. Daselbst findet sich noch eine ähnliche, aber neue Art, *T. nigristigma.* Andere neue Arten sind *Esenbeckia neglecta*, die an *E. fasciata* erinnert; eine *Erephopsis (soledadei),* die der *nigricans* n. sp. aus Espirito Santo ähnlich sieht; endlich kleine Arten, die zum Teil dem *T. taeniotes* nahestehen.

Lista dos tabánidas colecionados no Xerém de Fevereiro 1907 até Fevereiro 1908.

(Verzeichniss der in Xerém vom Februar 1907 bis Februar 1908 gesammelten Arten.)

1. Erephopsis sorbens Wied.
2. » winthemi Wied.
3. » leucopogon Wied.
4. Bombylopsis (n. gen.) nitens Bigot.
5. Diatomineura tabanipennis Macq.
6. » exeuns Walker.
7. Esenbeckia fuscipennis Wied. (Typus et var.)
8. Chrysops costatus Fabr.
9. » leucospilus Wied.
10. » laetus Wied.

11. Diachlorus bivittatus Fabr.
12. Lepidoselaga lepidota Wied.
13. Dichelacera alcicornis Wied.
14. » januarii Wied.
15. » flava Wied.
16. » immaculata Macq.
17. » fuscipennis Macq.
18. Tabanus macrodonta Macq.
19. » aurora Macq.
20. » impressus Wied.
21. » cinerarius Wied.
22. » triangulum Wied.
23. » modestus Wied.
24. » trivittatus Fabr.
25. » trilineatus Latr.
26. » obsoletus Wied.
27. » planiventris Wied.
28. » litigiosus Walker
29. » quadripunctatus Fabr.
30. » maculipennis Macq.
31. » punctipennis Macq.
32. » mexicanus L.
33. » leucaspis Wied.
34. » marginatus Macq.
35. » aphanopterus Wied.
36. » fuscus Wied.

Acrecentamos mais trez especies achadas mais tarde entre o material colhido em Xerém:

In dem in Xerém gesammelten Material wurden noch nachträglich folgende drei Arten aufgefunden:

37. Diachlorus distinctus Lutz.
38. Stibasoma thiotaenia Wied.
39. Tabanus scythropus Wied.

Lista de outros Tabánidas da coleção de Manguinhos encontrados no litoral do Rio de Janeiro.

(Verzeichniss anderer Tabaniden aus der Sammlung von Manguinhos, welche im Küstengebiet von Rio de Janeiro vorkommen.)

1. Erephopsis fulvithorax Wied.
2. » venosa Wied.
3. Erephopsis nigripennis Guérin
4. Acanthocera longicornis Macq.
5. Tabanus viridiventris Wied.
6. » importunus Wied.
7. » comitans Wied.

Lista de outros Tabánidas da coleção de Manguinhos colecionados no Estado de Minas.

(Verzeichniss der andern im Staat Minas gesammelten Tabaniden aus der Sammlung in Manguinhos.)

1. *Erephopsis auricincta* n. sp., Barbacena.
2. » *nubiapex* n. sp., Barbacena.
3. » winthemi Wied., Juiz de Fóra.
4. » sorbens Wied.
5. » xanthopogon Macq.
6. Bombylopsis nov. gen. analis Fabr. (?) Barbacena.
7. » nov. gen. leonina n. sp., Barbacena.
8. Esenbeckia ferruginea Macq., Bicudos.
9. Chrysops fusciapex n. sp., Barbacena.
10. » laetus Wied., Barbacena.
11. » molestus Wied., Barbacena.
12. » costatus Fabr., Juiz de Fóra.
13. » Selasoma tibiale Wied., Lassance.
14. Tabanus aurora Macq.
15. » monochroma Wied., Barbacena.
16. » fuscipennis Wied., Barbacena.
17. » leucaspis Wied., Bicudos.
18. » punctipennis Macq., Juiz de Fóra.

As novas denominações de generos e especies não escritas em italico já foram anteriormente estabelecidas por um de nós (Lutz).

Die nicht in Cursiv gedruckten neuen Genus- und Speciesnamen wurden schon früher von einem von uns (Lutz) aufgestellt.

Sobre a Amœba diplomitotica n. sp.

Contribuição para o estudo da divizão nuclear nas amebas

pelo

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistente do Instituto

(Estampa 2)

Ueber eine neue Amoebenart, Amoeba diplomitotica.

Beitrag zum Studium der Kernteilung bei den Amoeben

von

Dr. H. de Beaurepaire Aragão,

Assistenten am Institut

(Tafel 2)

Entre as diferentes amebas de agua doce que, nestes ultimos tempos, tivemos ocazião de observar no Instituto, uma se nos deparou, com um processo de divizão bastante curiozo que procurámos observar por menor, sem esquecer tambem outras questões referentes á sua morfologia e biolojia. Aprezentamos, a seguir, o rezultado de nossas pesquizas sobre o assunto.

A *Amœba diplomitotica* prolifera muito bem, em geral, tanto nas cubas de cultura assim como nos meios artificiais liquidos ou solidos; nestes, porem, sua vejetação, embora abundante não dá logar ao aparecimento de formas tão dezenvolvidas e de estrutura tão nitida como nos meios liquidos, além de que o enquistamento, muito mais precoce, apressa tambem as fazes de vejetação da ameba, impedindo a boa observação dellas.

Nas infuzões vejetais, principalmente naquellas em que a prezença de paramecios diminue a quantidade de bacterios, em certa proporção, é que a ameba encontra as melhores condições de proliferação.

Desde que em uma cultura as amebas proliferam em abundancia, convem observal-as seguidamente, quer a fresco, quer em pre-

Unter den verschiedenen Süsswasseramoeben, welche wir in letzter Zeit in diesem Institute zu beobachten Gelegenheit hatten, kam uns eine vor, deren Teilungsprozess ziemlich merkwürdig ist, weshalb wir ihn eingehend zu beobachten versuchten, wobei wir auch die anderen Fragen der Morphologie und Biologie nicht ausser Acht liessen. Wir geben nachstehend die Resultate unserer einschlägigen Untersuchungen:

Die *Amoeba diplomitotica* vermehrt sich im Allgemeinen sehr gut, sowohl in den Kulturgläsern, als in den verschiedentlichen künstlichen, flüssigen und festen Nährmedien. Auf letzteren giebt sie jedoch, trotz reichlichen Wachsthums, keine so deutlichen Entwicklungs- und Strukturformen, als in flüssigen Kulturmedien, abgesehen davon, dass die viel frühzeitigere Incystierung auch die Vegetationsformen der Amoeben beschleunigt und so eine gute Beobachtung derselben hindert.

Nur in vegetabilischen Infusionen, besonders solchen, bei welchen die Gegenwart von Paramaecien die Bacterienmengen einigermassen beschränkt, findet die Amoebe die günstigsten Existenzbedingungen. Sobald sich in einer Kultur die Amoeben reichlich vermeh-

parados fixados e córados, para que se possa surpreender as fazes interessantes do seu ciclo e, principalmente aquellas que se referem á divizão nuclear. A tecnica mais recomendavel para a confecção de preparações fixadas e vantajozas ao estudo é a de se fazerem preparados totais sobre laminula e o emprego do processo humido de Schaudinn, seguido de coloração pelo metodo de Heidenhain com a hematoxilina ferrea.

Morfolojia e biolojia: A forma da ameba, quando em repouzo, é arredondada aprezentando ella então de 20 a 30 *mikra* de diametro. Desde, porem, que entra em movimento toma configuração mais variada pela constante emissão de pseudopodios em uma ou outra porção do seu corpo. Estes pseudopodios que são unicos, de egual largura e comprimento que o resto do corpo da ameba e, neste cazo, quazi sempre unicos, ou então são estreitos, longos, multiplos, assestando-se em qualquer ponto, não raro tomando dispozição radiada em torno ao endoplasma do protozoario. Quer uns quer outros são, ao se formarem, apenas constituidos por ectoplasma; o endoplasma nelles penetra só depois de perfeitamente constituidos.

Os pseudopodios formam-se sucessivamente, com pequeno intervalo, permitindo á ameba rapido deslocamento, quer numa só direção, quando se formam sucessivamente no mesmo ponto, quer alterando a quazi todo o instante a orientação do movimento pela emissão de prolongamentos sem a mesma regularidade de localização.

Estando a ameba em movimento, com a formação de pseudopodios e a penetração nelles do endoplasma se dá a constante deslocação dos elementos nelle contidos, nucleos, vacuolos, incluzões etc.

O protoplasma da ameba é fluido, nelle se distingue ectoplasma hialino e um endoplasma, pouco refrinjente, alveolarmente estruturado no qual se veem granulações diversas, bacterios, vacuolos dijestivos e pulsateis e o nucleo.

Os bacterios existem, ás vezes, em grande abundancia e tem o aspeto de pequenos corpusculos e massas refrinjentes.

ren, ist es geboten, dieselbe anhaltend, teils in frischen, theils in fixierten und gefärbten Präparaten zu verfolgen, um die interessanten Phasen ihres Entwicklungszyklus ertappen zu können, ganz besonders diejenigen, welche sich auf die Kernteilung beziehen. Die empfehlenswerteste Technik für die Herstellung günstiger Präparate besteht in der Anwendung von Deckglaspräparaten, welche nach der feuchten Methode, von SCHAUDINN fixirt und mit HEIDENHAIN'schem Eisenhaematoxylin gefärbt werden.

Morphologie und Biologie: In Ruhe hat die Amoebe eine rundliche Form und einen Durchmesser von 20—30 Mikra; sobald sie sich indessen in Bewegung setzt, nimmt sie die verschiedensten Formen an, indem sie beständig von irgend einem Teile ihres Körpers Pseudopodien aussendet. Diese sind entweder von gleicher Länge und Breite, als der Rest des Leibes, und dann fast immer in der Einzahl, oder schmal, lang und in Mehrzahl, indem sie an irgend einer Stelle auftreten und sich nicht selten strahlenförmig um das Endoplasma der Amoebe gruppiren. Die einen, wie die andern, bestehen bei ihrer Bildung nur aus Ectoplasma und das Endoplasma dringt in dieselben erst nach ihrer völligen Ausbildung. Die Pseudopodien bilden sich successiv mit kurzen Intervallen, wobei sich die Amoebe rasch fortbewegt, entweder in einer Richtung, wenn dieselben fortwährend am selben Punkte auftreten, oder unter fortwährender ändernder Orientirung, wenn die Aussendung der Fortsätze ohne solche regelmässige Lokalisation stattfindet. Bewegt sich die Amoebe unter Bildung von Pseudopodien und Eindringen des Endoplasmas in dieselben, so erfolgt eine konstante Dislokation der darin enthaltenen Elemente, Kern, Vacuolen, Einschlüsse etc.

Das Protoplasma der Amoebe ist flüssig und man unterscheidet darin ein hyalines Ectoplasma und ein wenig lichtbrechendes Endoplasma von alveolärer Structur, in dem sich verschiedene Granulationen, Bacterien, verdauende und pulsirende Vacuolen und der Kern erkennen lassen. Bacterien sind manchmal in grosser Anzahl vorhanden und erschei-

Os vacuolos dijestivos aparecem sob a forma de pequenas zonas claras no interior das quais se vê muito frequentemente substancia em via de ser dijerida.

Quanto aos vacuolos pulsateis são elles multiplos, raramente menos de 3 ou mais de 7; um delles aprezenta volume muito maior que qualquer dos outros. Desde que este grande vacuolo pulsa, dous dos menores fundidos e, que tem por isso adquirido maior volume vem substituir o que dezapareceu, ao passo que outros vacuolos menores vão surjindo. O vacuolo maior existente no endoplasma, geralmente nelle ocupa as mais variadas pozições e n'elle se desloca a cada momento, ao passo que os vacuolos menores se deparam agrupados, quazi sempre em um só ponto, que é a porção posterior do corpo da ameba, durante o movimento.

O nucleo da *Amœba diplomitotica* é vezículozo; a fresco, aparece como pequena massa circular de contornos nitidos, de 3 a 4 *mikra* de diametro, menos refrinjente que o endoplasma que o cerca.

Examinado com maior individuação e em preparações bem coradas verifica-se que é constituido por membrana nitida duplamente contornada, a cuja face interna se aplicam numerozas pequenas massas de cromatina, ligadas umas a outras por delgados filamentos acromaticos. A esta camada de cromatina se segue uma zona circular de substancia acromatica cujo interior é ocupado por grande cariozoma no interior do qual ainda se pode distinguir nas preparações a fresco, ou nas bem diferenciadas, um pequeno centriolo. A estrutura do cariozoma não é homojenea, nelle se podem distinguir duas substancias diversas, uma de natureza plastinica e outra com carateres de cromatina que se acha distribuida sobre a primeira, sob a forma de pequenas massas de colorido mais carregado. Est. 2, fig. 1.

Esboçada a morfolojia da ameba e principalmente a de seu nucleo passemos a tratar da divizão nuclear que se processa debaixo de aspeto bastante curiozo, e creio, pelo menos até certo ponto, inedito.

nen als kleine, lichtbrechende Körperchen. Die Verdauungsvacuolen erscheinen in der Form kleiner heller Stellen, in deren Innern man öfters Substanzen findet, welche eben der Verdauung unterliegen.

Die pulsierenden Vacuolen existieren in der Mehrzahl, selten weniger als drei, oder mehr als sieben; eine derselben bietet ein viel grösseres Volumen, als irgend eine der anderen. Sobald eine dieser Vacuolen pulsiert, treten zwei kleinere, die sich vereinigt und dadurch an Volum gewonnen haben, an ihre Stelle, während andere kleinere Vacuolen auftreten. Die grösste Vacuole, welche im Endoplasma existiert, kann in demselben die verschiedensten Stellen einnehmen und verschiebt sich fortwährend, indessen die kleineren Vacuolen in Gruppen auftreten und zwar gewöhnlich in einem Punkte, welcher bei den Bewegungen den hintersten Teil des Amoebenkörpers bildet.

Der Kern der *Amoeba diplomitotica* ist blasig; frisch erscheint er als kleine, runde, scharf umschriebene Masse von 3—4 Mikra Durchmesser und ist weniger lichtbrechend als das Endoplasma, welches ihn umgiebt. Bei eingehender Untersuchung und in gefärbten Präparaten konstatirt man, dass er aus einer deutlichen, doppelt kontourirten Membran besteht, an deren Innenseite zahlreiche kleine Chromatinmassen liegen, welche miteinander durch dünne achromatische Filamente verbunden sind. Auf diese Schicht von Chromatin folgt eine Zone von Kreisen achromatischer Substanz, deren Inneres von einem grossen Caryosom eingenommen wird, in welchem man noch in frischen oder gut differenzierten Präparaten ein kleines Centriol unterscheiden kann. Die Struktur des Caryosoms ist nicht homogen, vielmehr kann man in demselben zwei verschiedene Substanzen unterscheiden, eine von Plastinnatur und eine andere mit den Charakteren des Chromatins, welche in der Form kleiner, stärker gefärbter Massen auf der ersteren verteilt ist. Tafel 2 Fig. 1.

Nachdem wir so die Morphologie der Amoebe und besonders ihres Nucleus dargestellt haben, wollen wir uns mit der Kernteilung befassen, welche ein ziemlich eigentüm-

A maioria dos processos de divizão assinalados para as amebas até hoje conhecidas é a da amitoze; ja existe, porem, um pequeno grupo desses protozoarios em que se tem assinalado a existencia de divizão carioquinetica, se bem que ainda evoluindo de modo um tanto primitivo.

A primeira menção de processo de divizão indireta nas amebas deve-se a Schaudinn (1) que a observou na *Amœba binucleata.* Algum tempo depois Awerinzew (2) verificou egualmente o mesmo tal processo na *Amœba proteus.*

Ulteriormente Vahlkampf (3) descreveu, na *Amœba limax,* um processo de divizão mitozica, mais tipico que os precedentes, caraterisado pela formação de placas polares, pela divizão do cariozoma e pelo aparecimento sobre os filamentos acromaticos que uniam essas placas de 3 cromozomios que depois se dividiam e se dirijiam para as placas polares onde, juntamente com ellas, rejeneravam os novos nucleos.

Prowazek, (4) e Leyden Löwenthal (5) assinalam na *Amœba buccalis* a existencia de mitoze primitiva.

Wenyon, (6) na *Amœba muris,* tambem conseguiu observar algumas fazes em que se percebe a divizão mitozica dessa ameba.

Mais recentemente, Doflein (7) assinalou, na *Amœba vespertilio,* a existencia de divizão indireta. Todavia porém, na *Amœba buccalis,* e nesta ultima, a carioquineze se manifesta no cariozoma, ao passo que os elementos do trofo-nucleo se dividem amitozicamente.

A *Amœba diplomitotica* aprezenta um processo de divizão indireta que se manifesta de dous modos diversos.

Uma das variedades no processo de divizão da ameba é caraterizado pela existencia de mitoze dupla do cariozoma e dos elementos do trofo-nucleo; a outra assinala-se pela divizão direta do cariozoma e indireta do trofo-nucleo.

Vejamos cada um dos processos de per-si, a começar pelo de dupla mitoze.

liches und, wie ich glaube, wenigstens teilweise, noch unbeschriebenes Bild bietet.

Die Mehrzahl der von Amoeben berichteten Teilungsprozesse gehört zur Amitose; es existiert nur eine kleine Gruppe dieser Protozoen, bei welchen das Vorhandensein einer caryocinetischen Teilung angegeben ist, die sich übrigens in ziemlich primitiver Weise abspielt.

Die erste Erwähnung eines indirekten Teilungsprozesses bei den Amoeben verdanken wir SCHAUDINN, (1) der denselben bei der *Amoeba binucleata* beobachtete. Einige Zeit später stellte AWERINZEW (2) ebenfalls das Vorkommen eines solchen Prozesses bei der *Amoeba proteus* fest. Später beschrieb VAHLKAMPF (3) bei der *Amoeba limax* einen mitotischen Kernteilungsprozess, der typischer als die vorstehenden ist. Derselbe kennzeichnet sich durch die Bildung von Polplatten, die Teilung des Caryosoms und das Auftreten von drei Chromosomen auf den achromatischen Filamenten, welche die Polplatten verbinden; diese teilen sich darauf und begeben sich zu den Polplatten, um, zusammen mit diesen, die neuen Amoebenkerne zu bilden.

PROWAZEK (4) und LEYDEN-LÖWENTHAL (5) geben bei der *Amoeba buccalis* dle Existenz einer primitiven Mitose an. Auch WENYON (6) gelingt es bei der *Amoeba muris* einige Phasen zu beobachten, aus welchen man die mitotische Teilung dieser Amoebe erkennt.

Neuerdings teilte DOFLEIN (7) das Vorkommen der indirekten Teilung bei *Amoeba vespertilio* mit; jedoch sowohl bei dieser, als bei der *Amoeba buccalis* zeigt sich die Caryocinese am Caryosom, während sich die Elemente des Aussennucleus amitotisch teilen.

Die *Amoeba diplomitotica* zeigt einen indirekten Teilungsprozess, der sich auf zwei verschiedene Weisen äussert. Eine derselben kennzeichnet sich durch die Existenz einer doppelten Mitose des Caryosoms und der Elemente des Aussenkerns; die andere äussert sich durch eine direkte Teilung des Caryosoms und eine indirekte des Aussennucleus. Wir betrachten nun beide Prozesse und beginnen mit demjenigen der doppelten Mitose.

Dieser Teilungsprozess ähnelt demjenigen sehr, den wir bei der *Polytomella agilis* be-

Este processo de divizão muito se assemelha áquelle que assinalaremos para a *Polytomella agilis*. Sua primeira faze carateriza-se pela fragmentação do cariozoma da ameba e pela dispozição radiaria que, em torno delle, tomam os elementos do nucleo exterior. Est. 2, fig. 2.

Em seguida os cromozomios do cariozoma, orientados pelos dous centriolos orijinarios da divizão do primitivo do nucleo, na faze precedente, começam a se separar em dous grupamentos opostos, ao mesmo tempo que os cromozomios do nucleo exterior se deslocam para os lados do cariozoma, já então um pouco alongado e ahi se agrupam circumdando-o. Est. 2, fig. 3.

Em faze mais adiantada os cromozomios do cariozoma aparecem separados em dous grupamentos nitidos, ligados um ao outro por delicados filamentos acromaticos e pelo filamento de união dos centriolos, geralmente bastante vizivel. Os cromozomios do nucleo exterior precedentemente colocados em torno do cariozoma, vêm-se dispor, então, no espaço que fica entre os dous grupos de cromozomios do cariozoma, tomando aí uma dispozição quazi perpendicular ao maior eixo da figura de divizão.

Já então a membrana nuclear dezapareceu por completo e a figura de divizão aparece no interior de um espaço claro sem limites nitidos. Est. 2, fig. 4.

As fazes seguintes do processo são assinaladas pelo afastamento progressivo dos grupamentos de cromozomios do cariozoma que passam a constituir, nos extremos da zona de divizão, duas placas polares lijeiramente concavas, internamente, nas quais se pode observar, ás vezes, com muita nitidez um centriolo ligado ao do lado oposto por filamento intermediario sempre bastante distinto — Os filamentos acromaticos e os cromozomios do nucleo exterior não aprezentam alterações sensiveis, apenas aquelles se tornaram mais longos. Est. 2, fig 5 e 6.

Continuando o afastamento das placas polares, observam-se certas modificações na figura de divizão; toma o aspeto de fuzo

schreiben werden. Seine erste Phase charakterisiert sich durch die Fragmentirung des Caryosoms der Amoebe und durch die radiäre Anordnung der Elemente des Aussennucleus um dieselbe. (Tafel 2 Fig. 2). Hierauf beginnen die Chromosomen des Caryosoms, orientiert durch die zwei Centriolen, welche in der vorhergehenden Phase durch die Teilung des ursprünglich im Kerne vorhandenen entstehen, sich in zwei entgegengesetzte Gruppen zu teilen, während die Chromosomen des Aussennucleus sich nach dem, schon jetzt etwas verlängerten, Caryosoma begeben und sich um dasselbe gruppiren. (Tafel 2 Fig. 3). In einer mehr vorgeschrittenen Phase erscheinen die Chromosomen des Caryosoms in zwei deutliche Gruppen getrennt, welche unter sich durch zarte achromatische Filamente und den, gewöhnlich deutlich sichtbaren, Verbindungsfaden der Centriolen im Zusammenhang stehen. Die vorher um das Caryosom gelagerten Chromosomen des Aussennucleus rücken nun nach dem freien Raume, welcher zwischen den beiden Gruppen der Chromosomen des Caryosoms bleibt und ordnen sich dort fast senkrecht zur grössten Axe der Teilungsfigur.

Schon jetzt verschwinden die Kernmembranen fast völlig und die Teilungsfiguren erscheinen im Innern eines hellen Raumes, der keine deutliche Begrenzung zeigt. (Tafel 2 Fig. 4).

Die weiteren Phasen des Prozesses kennzeichnen sich durch fortschreitende Entfernung der Chromosomengruppen des Caryosoms, welche allmälich an den Enden der Trennungszone zwei, nach innen leicht konkave Polplatten bilden, in deren Innern man oft sehr deutlich ein Centriol erkennt, welches mit demjenigen der anderen Seite durch einen, immer sehr deutlichen, Verbindungsfaden zusammenhängt. Die achromatischen Filamente und die Chromosomen des Aussennucleus zeigen keine deutlichen Veränderungen, nur werden jene etwas länger. (Tafel 2 Fig. 5, 6). Während die Entfernung der Polplatten weiter geht, beobachtet man gewisse Modifikationen der Teilungsfigur; sie nimmt die Form einer länglichen Spindel an und auf den die

alongado e sobre os filamentos que unem as placas polares aparecem espalhadas, ocupando-os em quazi toda a extensão os cromozomios do nucleo exterior que precedentemente tomavam a dispozição anular em torno do maior eixo da zona nuclear. Est. 2, fig. 7.

Não tarda, porém, que o aspeto precedente se modifique, e continuando o afastamento das placas polares toma a figura de divizão certa conformação cilindrica, com o aspeto de um chouriço, mantendo-se porém a mesma a dispozição dos cromozomios do nucleo externo sobre os filamentos acromaticos. Est. 2, fig. 8.

Atinjido este periodo, pode se dizer que se está na metafaze do processo de divizão; daqui em diante tende tudo á constituição dos nucleos secundarios.

Observa-se então, como primeiro indicio do novo curso que vai tomar o processo, o estreitamento da figura precedente na parte media do seu comprimento, ao mesmo tempo que os cromozomios que aí se achavam se afastam para um lado e para outro e vão constituir dous agrupamentos conicos opostos pelos vertices e com bazes voltadas para as placas polares, de que são separados por pequena zona clara, separada por filamentos acromaticos atravessando, de um lado a outro, a zona estreitada. Vê-se o filamento de união dos centriolos. Est. 2, fig. 9.

Adiantando-se o processo, observa-se que os cromozomios do nucleo exterior, assim como as placas polares se tornam, aos poucos, compactos e não deixam perceber mais a separação nitida dos cromozomios aí existentes. Logo depois se nota que, progressivamente, os cromozomios do nucleo exterior que constituem o cone aos poucos, se vão desprendendo delle e começam a passar para o espaço claro que separa a placa polar da massa de elementos do nucleo exterior, e aí surjem dispostos em fila, formando uma especie de corôa em torno á essa placa. Est. 2, fig. 10.

Nesta ocazião, a zona nuclear se torna muito alongada no que tambem é acompa-

Polplatten verbindenden Fäden erscheinen, zerstreut und dieselben nach und nach fast in ihrer ganzen Ausdehnung bedeckend, die Chromosomen des Aussennucleus, welche vorher ringförmig um die grosse Axe des Kernfeldes gelagert waren. (Tafel 2 Fig. 7).

Dieses Bild ändert sich jedoch bald wieder und während sich die Polplatten weiter entfernen, nimmt die Teilungsfigur eine Cylinder- oder Wurstform an, wobei aber dieselbe Anordnung der Chromosomen des Aussenkerns auf den achromatischen Filamenten weiter besteht.

Diese Periode kann man als die Metaphase des Teilungsprozesses ansprechen; von jetzt ab geht die ganze Tendenz auf die Bildung der Tochterkerne.

Man bemerkt dann als erstes Anzeichen der neuen Richtung, welche der Prozess einschlägt, eine Einschnürung der vorstehenden Figur in der Mitte ihrer Längsrichtung, während die dort befindlichen Chromosomen nach beiden Seiten abrücken, um zwei konische Gruppen zu bilden, deren Spitzen einander zugewendet sind, während die Basen nach den Polplatten gerichtet sind, von denen sie durch eine helle, von achromatischen Fäden durchsetzte Zone getrennt werden. Den Centralfaden, welcher die beiden Centriolen verbindet, sieht man diese schmalen, hellen Zonen von einer Seite zur andern durchsetzen. (Tafel 2 Fig. 9). Bei weiterem Fortschreiten des Prozesses sieht man, wie die Chromosomen des Aussennucleus und die Polplatten sich immer dichter anordnen, so dass die deutliche Trennung der daselbst vorhandenen Chromosomen verwischt wird. Kurz darauf bemerkt man, dass die Chromosomen des Aussennucleus, welche den Konus bilden, sich allmälig fortschreitend von demselben ablösen und dem hellen Raume zurücken, welcher die Polplatten von der Masse der Elemente des Aussenkerns trennt, und sich dort in einer Reihe ordnen, welche eine Art von Kranz um diese Platte bildet. (Tafel 2 Fig. 10). Bei dieser Gelegenheit zieht sich die Kernzone sehr in die Länge und wird darin vom Protoplasma der Amoebe begleitet, welche sich im sel-

nhada pelo protoplasma da ameba que, então se tem alongado no mesmo sentido e, não raro já se começa a observar os primeiros sinais de divizão do protoplasma que se faz diretamente, pelo estreitamento progressivo delle, na parte media.

Coincide com os primeiros indicios da divizão do protoplasma o rompimento, na parte media, do filamento de união dos centriolos, que ainda ligava os produtos da divizão nuclear, izolando-se, então, de cada lado da ameba os elementos dos futuros nucleos.

A's vezes a segmentação do protoplasma é tão rapida que as amebas já se acham izoladas, achando-se ainda o nucleo em faze bastante atrazada de reconstituição nuclear, Est. 2, fig. 11.

A' medida que os cromozomios do nucleo exterior vão passando para a zona intermediaria acima mencionada, o cone primitivo de cromozomios vai aos poucos diminuindo de tamanho.

Por sua vez a placa polar aumenta de volume e vai se arredondando e tomando a forma do futuro cariozoma que della se rejenerará. O contorno da zona nuclear começa a se arredondar, vae se tornando mais nitido, e nelle não tarda a se esboçar uma membrana, cujos extremos tocam os restos do cone do nucleo exterior. Os cromozomios do nucleo exterior que, até ha pouco, formavam corôa em torno da placa polar, começam a cercar o futuro cariozoma, já então ligado á membrana por delicados filamentos acromaticos. Est. 2, fig. 12.

Daqui em diante, a reconstituição nuclear se processa rapidamente e em breve o cariozoma aprezenta sua forma esferica normal, ocupa o centro do nucleo, emquanto os cromozomios do nucleo exterior tomam a sua dispozição tipica junto á membrana nuclear.

Termina aqui o processo de divizão vejetativa da ameba. Durante as fazes delle se observa que o rizopode, á medida que progride o fenomeno aprezenta cada vez maior diminuição da motilidade, até se completar a divizão celular e a rejeneração do nuben Sinne streckt; nicht selten beginnen dann bereits die ersten wahrnehmbaren Erscheinungen der Protoplasmateilung, welche direkt durch Einschnürung im mittelsten Teile erfolgt. Mit den ersten Anzeichen derselben koinzidiert die in der Mitte erfolgende Durchschnürung des Verbindungsfadens der Centriolen, welcher die Produkte der Kernteilung noch zusammen hielt, worauf sich auf beiden Seiten der Amoebe die Elemente der zukünftigen Kerne isolieren.

Manchmal ist die Teilung des Protoplasmas eine so rasche, dass man die Amoeben schon getrennt findet, während ihre Kerne sich noch in einer wenig vorgeschrittenen Phase der Rekonstitution befinden. (Tafel 2 Fig. 11).

In dem Maasse, wie die Chromosomen des Aussennucleus nach der oben erwähnten intermediären Zone rücken, nimmt der ursprüngliche Konus der Chromosomen nach und nach an Grösse ab. Dagegen nimmt die Polplatte an Volum zu, rundet sich ab und nimmt die Form des zukünftigen Caryosoms an. Der Umriss der Kernzone beginnt sich abzurunden und immer deutlicher zu werden und bald zeichnet sich eine Membran, deren Enden die Reste des Aussennuclearkonus ausziehen. Die Thromosomen des Aussennucleus, welche bis vor Kurzem einen Kranz um die Polplatten bildeten, beginnen das zukünftige Caryosom zu umgeben, welches noch durch zarte achromatische Fäden mit der Membran verbunden ist. (Tafel 2 Fig. 12).

Von nun an geht die Rekonstitution des Nucleus rasch vor sich und bald zeigt das Caryosom seine normale sphärische Form, wobei es das Zentrum des Nucleus einnimmt, während die Cromosomen des Aussennucleus ihre typische Lage an der Kernmembran eingenommen haben.

Hier endet der vegetative Teilungsprozess der Amoebe. In seinen verschiedenen Phasen beobachtet man, dass dieselbe, in dem Maasse, wie der Prozess fortschreitet, eine zunehmende Verminderung der Beweglichkeit zeigt, bis die Zellteilung und Regeneration des Kernes eingetreten ist, worauf die Amoebe ihre ursprünglichen Bewegungen wieder aufnimmt.

cleo; depois do que, recupera seus movimentos, como primitivamente.

Alem do processo de divizão vejetativa da ameba, pelo processo de dupla mitoze que acabamos de descrever e que é muito semelhante ao por nós observado na *Polytomella agilis* aprezenta a *Amœba diplomitotica* um segundo aspeto de divizão mais simplificada que a anterior, ao que já nos referimos precedentemente e do qual, agora, passamos a mencionar as principais fazes.

O inicio da divizão, neste cazo, assinala-se pelo alongamento do cariozoma e pelo agrupamento em torno do maior eixo delle, na parte mediana dos elementos do nucleo exterior. Est. 2, fig. 13. Em seguida se observa que, a medida que se alonga o cariozoma, começa a se estreitar na parte media, ao mesmo tempo que nesse ponto aparecem numerozos filamentos acromaticos em torno dos quais se dispoem os cromozomios do nucleo exterior sob a forma de placa equatorial muito nitida. Est. 2, fig. 14.

A seguir, observa-se que, cada vez mais, se estreita o cariozoma na parte central, ao passo que as duas massas que se vão formando nas extremidades da figura, se afastam um pouco uma da outra e afinal apenas ficam ligadas pelo filamento intermediario dos centriolos e pelo filamentos acromaticos cujo numero aos poucos foi aumentando. A placa de cromozomios do nucleo exterior não aprezenta até aqui modificação notavel. Nenhum vestijio resta na zona nuclear da membrana primitiva. Est. 2, fig. 15, 16, 17.

Quando a divizão dos cariozomas já tem atinjido o limite maximo e que elles se acham transformados em duas massas apenas ligadas pelo filamento intermediario dos centriolos, dá-se então o desdobramento da placa primitiva de cromozomios do nucleo exterior, em duas placas filhas, cujos elementos muito regularmente se enfileiram sobre os filamentos acromaticos. Est. 2, fig. 18.

Cada uma dessas placas filhas não tarda a se dirijir para um dos cariozomas secundarios, já então izolados e completamente redondos, e em torno delles se vão agrupando

Ausser dem Prozesse der vegetativen Teilung durch doppelte Mitose, den wir soeben beschrieben haben und welcher dem von uns bei *Polytomella agilis* beobachteten sehr ähnlich ist, zeigt die *Amoeba diplomitotica* noch eine zweite Teilungsweise, welche einfacher als die vorige ist; wir haben dieselbe bereits erwähnt und wollen jetzt die wichtigsten Phasen derselben kurz beschreiben.

In diesem Falle kennzeichnet sich der Beginn des Prozesses dadurch, dass das Caryosoma sich verlängert und die Elemente des Aussennucleus sich um die Mitte seiner längsten Axe gruppiren (Tafel 2, Fig. 13). Hierauf bemerkt man, dass das Caryosom, in dem Maasse wie es sich streckt, sich auch in der Mitte einzuschnüren beginnt, während an dieser Stelle zahlreiche achromatische Fäden auftreten, um welche sich die Chromosomen des Aussennucleus unter der Form einer sehr deutlichen Aequatorialplatte anordnen (Tafel 2, Fig. 14). Hierauf sieht man, wie das Caryosom in seinem mittleren Teile sich immer mehr einschnürt, während die beiden Massen, die sich an den Enden der Figur bilden, sich etwas von einander entfernen, bis sie schliesslich nur durch die Verbindungsfäden der Centriolen und, die allmälig an Zahl zunehmenden, achromatischen Fäden verbunden sind. Die Chromosomenplatte des Aussennucleus zeigt bis dahin keine bemerkenswerte Veränderung. In der Kernzone bleibt keine Spur der ursprünglichen Membran erhalten. (Tafel 2, Fig. 15, 16 u. 17). Wenn die Teilung der Caryosome bereits ihre äusserste Grenze erreicht hat und dieselben sich in zwei Massen verwandelt haben, welche nur durch die Verbindungsfäden der Centriolen zusammenhängen, dann erfolgt die Teilung der ursprünglichen aussennucleären Chromosomenplatte in zwei Tochterplatten, deren Elemente sich sehr regelmässig auf den achromatischen Fäden aufreihen. (Tafel 2, Fig. 18). Jede dieser Tochterplatten beginnt sofort, sich nach einem der sekundären Caryosome zu begeben (welche dann schon vollständig isoliert und abgerundet sind), worauf sie sich um dasselbe lagert und es zu umfassen sucht. An den Grenzen der Kernzone, deren Länge dann das Doppelte

e procurando cercal-os. Est. 2, fig. 19. Nos limites da zona nuclear, cujo comprimento não excede então o dobro da largura, começa se a notar a reconstituição da membrana, assim como os primeiros indicios da separação dos futuros nucleos. Como concluzão do processo obtem-se no interior da ameba, dous nucleos completamente constituidos, collocados um ao lado do outro. Est. 2, fig. 20.

O processo de divizão nuclear da ameba, mais simplificado neste cazo, nem sempre se faz com a regularidade e egualdade acima descritas; não muito raro é observar-se a divizão muito desegual dos cariozomas donde o constituir-se no interior da ameba dous nucleos de tamanho diverso. Est. 2, fig. 21, 22.

O processo de divizão nuclear acima descrito não se acompanha obrigatoriamente da divizão do protoplasma da ameba, muitas vezes até ha tempo della se processar 2 vezes, sem que o protoplasma se segmente, donde o 'aparecimento de amebas com 4 nucleos formados pelo processo acima.

A regra porém é que uma vez formados os dous nucleos, o protoplasma da ameba se segmente, ficando cada porção delle com um dos nucleos. Não se nota alteração na mobilidade da ameba, no decorrer das fazes de divizão.

Os dous processos de divizão da *Amœba diplomitotica* que acabamos de descrever parecem bem diversos um do outro e, tanto quanto podemos assegurar, destinados cada um delles a um processo de multiplicação do rizopode.

O processo de divizão por dupla mitoze, corresponde á divizão vejetativa da ameba; é o que assegura a regular e egual distribuição dos cromozomios do nucleo exterior e do cariozoma dos nucleos secundarios. Por ser processo de divizão mais complexo é, por isso mesmo, mais lento.

O segundo modo da divizão da ameba, ao contrario, se carateriza pela menor regularidade na distribuição dos cromozomios pelos nucleos secundarios; é, tambem, por ser menos complexo, mais rapido e o mais apro-

der Breite nicht überschreitet, fängt man an, die Rekonstitution der Membran und die ersten Anzeichen der Trennung der zukünftigen Kerne zu erkennen. Als Schluss des Prozesses erhält man im Innern der Amoebe zwei vollständig ausgebildete Kerne, welche neben einander gelagert sind (Tafel 2, Fig. 20). Der in diesem Falle vereinfachte Kernteilungsprozess der Amoebe vollzieht sich nicht immer mit der angegebenen Schnelligkeit und Gleichmässigkeit; nicht selten beobachtet man eine sehr ungleichmässige Teilung, so dass sich im Innern der Amoebe zwei Kerne von ungleicher Grösse bilden. (Tafel 2, Fig. 21, 22).

Der oben beschriebene Kernteilungsprozess wird nicht notwendig von der Teilung des Protoplasmas der Amoebe begleitet, ja derselbe findet oft Zeit, sich zu wiederholen, ohne dass das Protoplasma sich teilt, was zu dem Vorkommen von Amoeben mit vier auf obige Weise entstandenen Kernen führt. Die Regel ist jedoch, dass nach Bildung der beiden Kerne das Protoplasma der Amoebe sich teilt und jeder Teil desselben einen Kern behält. Man bemerkt dabei keine Veränderung der Beweglichkeit der Amoebe im Verlauf der Teilungsphasen.

Die beiden Teilungsprozesse der *Amoeba diplomitotica,* welche wir soeben beschrieben haben, verlaufen sehr verschieden von einander, obwohl sie, soviel wir versichern können, beide dem Zwecke der Vermehrung des Rhizopoden dienen.

Der Prozess der Teilung durch doppelte Mitose entspricht der vegetativen Teilung der Amoebe und garantiert die regelmässige und gleichmässige Verteilung der Chromosomen des Aussennucleus und des Caryosoms auf die sekundären Kerne. Als komplizierterer Teilungsprozess ist er auch eben deswegen ein langsamerer.

Im Gegensatz hierzu kennzeichnet sich die zweite Teilungsweise der Amoebe durch die geringere Regelmässigkeit der Verteilung der Chromosomen auf die sekundären Kerne; als weniger kompliziert, auch ist sie rascher und mehr geeignet, eine schnelle Vermehrung der Amoebe zu garantiren; die Teilung oder richtiger die Fragmentierung des Protoplasmas

priado a assegurar a rapida multiplicação da ameba; a segmentação do protoplasma, ou melhor, a fragmentação delle indica o seu relacionamento com o processo de divizão chizogonica da ameba.

Os dous aspetos diversos da divizão nuclear da *Amœba diplomitotica* foram os que observámos no decurso de nossas pesquizas e aos quais demos a interpretação que, de acordo com os fatos, nos pareceu mais lojica. Existe certa semelhança entre o processo de divizão da ameba que estudamos e a da *Amœba limax* pesquizada por Wahlkampf; é evidente, porem, que no nosso cazo a complexidade do fenomeno é bem maior.

E' bastante interessante sob o ponto de vista filojenetico assinalar a semelhança entre os processos de divizão da *Amœba diplomitotica* e da *Polytomella agilis,* ambos protozoarios tipicos de grupos diversos, embora relacionados, como as amebas e os flajelados.

A parte mais interessante da biolojia da *Amœba diplomitotica,* é incontestavelmente a divizão della.

O enquistamento nada tem de notavel; processa se como nas amebas do typo *limax.*

Os quistos, quando formados são circulares, e medem 7,5 μ. de diametro, são quazi eguais uns aos outros. Têm a côr amarelada e são limitados por duplo envoltorio constituido internamente por uma membrana de duplo contorno nitido e, externamente, por membrana de contorno externo um pouco irregular. Em cada quisto apenas se vê um nucleo; não conseguimos nelles observar qualquer indicio de multiplicação nuclear ou de autogamia. Egualmente nunca nos foi possivel encontrar, em qualquer periodo da evolução da ameba, fazes de copulação, como recentemente assinalaram na *Amœba diploidea* Hartmann e Nœgler.

deutet seine Verwandtschaft mit dem schizogonischen Teilungsprozess der Amoeben an.

Diese beiden verschiedenen Bilder der Kernteilung der *Amoeba diplomitotica* sind es, die wir im Laufe unserer Untersuchungen beobachteten und die wir so deuteten, wie es uns in Uebereinstimmung mit den Tatsachen, am logischsten erschien. Es besteht eine gewisse Aehnlichkeit zwischen dem Teilungsprozesse der Amoebe, welche wir studierten und demjenigen der *Amoeba limax*, welcher von VAHLKAMPF untersucht worden ist; jedoch ist es klar, dass in unserem Falle die Erscheinung eine weit kompliziertere ist. Vom phylogenetischen Gesichtspunkte aus ist es nicht uninteressant, die Aehnlichkeit zwischen den Teilungsprozessen der *Amoeba diplomitotica* und der *Polytomella agilis* hervorzuheben, zweier Protozoen, welche für zwei verschiedene, wiewohl verwandte Gruppen, wie die Amoeben und Flagellaten, typisch sind.

Der interessanteste Teil der Biologie der *Amoeba diplomitotica* ist unzweifelhaft ihre Teilung.

Die Incystirung bietet nichts bemerkenswertes und vollzieht sich wie bei den Amoeben vom *Limax*-typus. Die vollendeten Cysten sind rund und messen 7,5 Mikra im Durchmesser; sie sind einander fast gleich, von gelblicher Farbe und von einer doppelten Hülle umgeben, inwendig von einer Membran mit deutlich doppeltem Umrisse und auswendig von einer solchen mit etwas unregelmässiger äusseren Kontur. In jeder Cyste sieht man nur einen Kern; niemals haben wir in denselben irgend ein Anzeichen einer Kernvermehrung oder Autogamie bemerken können. Ebenso war es uns niemals möglich, in irgend einer Entwicklungsperiode unserer Amoebe Copulationsphasen anzutreffen, wie sie HARTMANN und NAEGLER bei der *Amoeba diploidea* neuerdings angegeben haben.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

LITERATURA

1) Schaudinn, F. — Ueber die Theilung von Amoeba binucleata. Sitzungs-Bericht der Gesellschaft N.-Freunde. Berlin, 1895.
2) Awerinzew. — Ueber die Theilung bei Amoeba proteus. Zool. Anz., 1904.
3) Vahlkampf, E. — Beiträge zur Behandlung und Entwicklungsgeschichte von Amoeba limax. Archiv für Protistenkunde, 1905. Vol. 5.
4) Prowazek. — Entamoeba buccalis n. sp. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. Vol. 21.
5) Leyden-Löwenthal. — Entamoeba buccalis (Prowazek) bei einem Fall von Mund-boden-Carcinom. — Charité Annalen, XXIX. Jahrgang.
6) Wenyon. — Protozoa of the intestine of Mice. Archiv f. Protistenkunde. Supplement I, 1907.
7) Doflein. — Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. Archiv f. Protistenkunde. Supplement I, 1907.

Contribuição para o estudo dos parazitas intraglobulares dos lacértidas

Plasmodium diploglossi n. sp. Plasmodium tropiduri n. sp.

pelos Drs.

H. de Beaurepaire Aragão e Arthur Neiva

Assistentes do Instituto.

(Estampa 3)

A contribution to the study of the intraglobular parasites of the lizards.

Two new species of **Plasmodium, Pl. diploglossi** n. sp. and **Pl. tropiduri** n. sp.

by Drs.

H. de Beaurepaire Aragão e Arthur Neiva

Assistents.

(Plate 3)

Até 1901 não se conhecia, nos animais de sangue frio, outros parazitas dos globulos vermelhos além das hemogregarinias. Nessa época, Simond descreveu um hematozoario pigmentado no sangue de uma tartaruga *(Trionyx indicus,* Gray) o qual elle denominou de *Hemamœba metchnikovi.* Mais tarde, em 1904, Castellani viu outro parazita da mesma natureza, no sangue do *Hemidactylus leschenaulti,* Gray e aproveitou a ocazião para crear com este hematozoario e o descrito por Simond, novo genero, *Hemocystidium,* a que elle dá carater provizorio, ao mesmo tempo que assinalava a grande semelhança entre esses parazitas e os hemoproteos das aves. A nós parece que os hematozoarios de Simond e Castellani deveriam ser incluidos entre os hemoproteos, até que o conhecimento mais completo do ciclo delles viesse justificar sua colocação em outro genero.

Estas considerações vêm a propozito de dous novos parazitas intraglobulares dos lacértidas, bem diferentes dos precedentes que tivemos, ha algum tempo, ocazião de observar e que, morfolojicamente, têm os caracteres dos plasmodios do tipo proteozoma das aves.

Up to 1901 the only intraglobular parasites known from cold blooded animals belonged to the haemogregarinae. At that date Simond described a pigmented haematozoon from the blood of a turtle (*Trionyx indicus* Gray) and gave it the name: *Haemamoeba metchnikoffi.* Later, in 1904, Castellani, having observed another parasite of the same kind in the blood of the *Hemidactylus leschenaulti,* Gray, established for this and the one observed by Simond a new genus: *Haemocystidium* which he considers as only provisory, noticing at the same time the great ressemblance between these forms and the haemoproteus of the birds. It seems to us that both haematozoa ought to be included in the genus *haemoproteus,* at least until a more perfect knowledge of their evolution might justify the establishment of a new genus.

These reflexions were made while we had the chance of observing two other blood-parasites of lizards which morphologically fol-

Um desses parazitas foi encontrado no sangue de *Diploglossus fasciatus* D. B. obtidos no Xerém, Estado do Rio, por um de nós (Neiva), o outro observámos em preparados de sangue de *Tropidurus torquatus,* Wied., que nos foram trazidos de Bicudos, Estado de Minas, pelo Dr. Carlos Chagas.

Atenta a semelhança morfolojica desses hematozoarios com os plasmodios, rezolvemos colocal-os nesse genero, dezignando-os respetivamente, *Plasmodium diploglossi* e *Plasmodium tropiduri,* até que o conhecimento mais completo venha mostrar a necessidade da incluzão delles em outro genero.

Plasmodium diploglossi

Este parazita é encontrado no sangue do *Diploglossus fasciatus,* vulgarmente conhecido por lagarto cobra, lacértida bastante raro e do qual, até agora, só tivemos ocazião de observar quatro exemplares, dous do Xerém, infetados, e os outros de Ouro-Fino, Estado de Minas, não parazitados.

Aqui no Instituto, tivemos vivo durante alguns dias, um dos exemplares de *Diploglossus* com grande infeção e foi com elle que conseguimos fazer as experiencias abaixo mencionadas.

Em primeiro logar tentámos infetar outros lacértidas *(Tropidurus torquatus, Ameiva surinamensis, Mabuia agilis,* D. B., *Hemidactylos mabuia)* inoculando-lhes por via intra-muscular, sangue retirado do animal infetado. Não foi possivel obter a infeção em numerozos animais inoculados.

Procurámos tambem fazer com que mosquitos diversos, *Culex confirmatus,* An., *Culex teniorhynchus,* Wied., muito comuns nos logares em que o lacértida é encontrado, o picassem; elles, porém, sempre se recuzaram a isso.

Tendo morrido, inesperadamente, o animal infetado que possuiamos não nos foi posivel experimentar com outros mosquitos e demais insetos sugadores de sangue e ixódidas. Nenhum ecto-parazita foi encontrado sobre os animais infetados ou não.

O estudo do parazita foi feito em preparações a fresco, entre lamina e laminula ou

low the type of the proteosoma of the birds. One of them was found in the blood of a *Diploglossus fasciatus,* D. B. caught by one of us (Neiva) in Xérem (State of Rio de Janeiro), the other was discovered in bloodsmears of a *Tropidurus torquatus,* Wied., brought by Dr. Carlos Chagas from Bicudos in the State of Minas. Considering the morphological ressemblance of these cytozoa with the plasmodia we shall include them in this genus as *Plasmodium diploglossi* and *tropiduri,* while waiting for a more complete knowledge which might oblige us to place them in another genus.

Plasmodium diploglossi n. sp.

This organism was found in the blood of the *Diploglossus fasciatus,* commonly known as *snakelizard,* a rather rare kind of which up to date we have only observed four specimens, two of which were infected, while the two others (from Ouro Fino in the State of Minas) where free from blood parasites.

One of them could be kept alive during some days; it showed a very strong infection and gave us the chance to perform some experiments. In first instance we tried to infect some other lizards *(Tropidurus torquatus, Hemidactylus mabuia, Ameiva surinamensis* and *Mabuia agilis* D. B.), by inoculating them in the muscles with blood obtained from the infected animal, but in all the numerous experiments we failed to reproduce the infection.

After that we tried to have the animal bitten by two kinds of mosquitos commonly found in the same places as the lizards *(Culex confirmatus* and *C. taeniorhynchus),* but both refused to bite.

The unexpected death of the infected animal prevented us from experimenting with more mosquitos and bloodsucking insects or

em gota pendente e em preparações fixadas pelo alcool metilico e córados pelo Giemsa.

O parazita é essencialmente intraglobular; nas preparações a fresco, quando ainda muito joven, aparece sob a fórma de pequena massa arredondada que não excede a 2 μ, colocada no protoplasma do globulo, junto a uma das extremidades. Aprezenta-se, então, constituido por pequena massa de protoplasma de estrutura finamente alveolar, de colorido amarelo palido, no interior está o nucleo que aí aparece sob a fórma de pequeno corpusculo arredondado. Córadas pelo Giemsa, estas fórmas se aprezentam com o aspeto de pequeno anel ou de pequena massa poligonal e são constituidas por porção de protoplasma córado em azul claro; no centro ou em uma das bordas existe pequena massa de cromatina intensamente corada em vermelho rubi e ás vezes ainda, pequeno vacuolo nutritivo. Est. 3, figs. 1, 2, 11 a, b, 12 e 13.

Em periodo mais adiantado do dezenvolvimento, o parazita começa a tomar a forma alongada e não tarda a se curvar sobre a extremidade do nucleo do eritrócito, começando a envolvel-o. Desde que o parazita tenha atingido certo dezenvolvimento, começa-se a observar nas fórmas pertencentes ao ciclo esquizogonico, a divizão nuclear e o aparecimento de granulos de pigmento castanho-escuro. Est. 3, figs. 3, 4, 5 e 12 b.

A influencia do parazitismo não tarda a se fazer sentir sobre os globulos; o colorido torna-se um pouco menos intenso, o nucleo se deforma, a celula aumenta de dimensões e aprezenta o contorno menos regular que normalmente; pode atinjir, então, 19 μ de comprimento, por 11 μ de largura, quando, normalmente, estas dimensões não excedem a 15×9 μ.

Continuando o parazita a se dezenvolver, cerca francamente o nucleo que se torna arredondado e, ás vezes, fundindo-se as extremidades, forma anel completo em torno delle, emquanto o globulo se aprezenta cada vez mais hipertrofiado.

Já se póde, então, observar no protoplasma do parazita, tanto a fresco, como nas preparaixodidae. We also failed to find ectoparasites on any of the four specimens.

The parasite was studied in fresh preparations, under coverslip and in hanging drops, as well, as in dry bloodsmears fixed in methylated alcohol and stained by Giemsa's fluid. It is essentially endoglobular being observed in fresh preparations, when still young, in the shape of small rounded bodies, not more than two mikra in diameter, inside and near to one end of the red bloodcells. They consist of a finely alveolar protoplasm of pale yellow colour enclosing a small rounded nucleus. In Giemsa's preparations they appear as small ringshaped or polygonal masses, stained pale blue, with rubycoloured particles of chromatin lying in the centre or more peripherically; sometimes a small vacuole is also found. (Plate 3, Fig. 1, 2, 11 a, b, 12, 13).

While the evolution is progressing the parasite takes a more elongated shape curling around the nucleus; at an early periode one detects in the forms belonging to the schizogonic cycle the division of the nucleus and the apparition of granules of dark brown pigment. (Plate 3, Fig. 4, 5, 12 b, c).

The influence of the parasite on the red bloodcells appears soon: the colour becomes paler, the nucleus is deformed, the cell increases and its outlines become less regular. It may attain 19:11 mikra while the normal dimensions never exceed 15:9 mikra. While continuing its growth the parasite includes completely the nucleus which becomes rounded; the ends of the parasite may unite so as to form a perfect ring.

In later stages the protoplasm of the parasite shows — in fresh, as well as in dry and stained preparations — a varying number of chromatin corpuscles and granules of pigment corresponding in number to the deve-

ções córadas, numero variavel de massas de cromatina e granulos de pigmento, em proporção com o dezenvolvimento delle, acumulados quazi todos em um ponto do protoplasma. Est. 3, figs. 12 e, f e 13 b.

Os esquizóntes, em faze mais adiantada de dezenvolvimento se aprezentam sob a fórma de massa de protoplasma cheia de fragmentos de cromatina e com mais pigmentos que nas fazes anteriores e ocupam todo ou quazi todo o protoplasma do eritrócito. Est. 3, figs. 7, 8, 9, 11 d e 13 c.

O numero de massas de cromatina nessas fórmas, não raro excedem a 40. Cada uma corresponde a um futuro merozoito, na ocazião da completa divizão do parazita. Est. 3, fig. 11 d. Os merozoitos, uma vez formados, se separam e vão parazitar novos eritrócitos. Em um campo de um de nossos preparados elles se encontravam livres entre os globulos. Est. 3, fig. 11 c. Nas preparações a fresco, porém, nunca lográmos observar a passajem dos merozoitos para o plasma ou para os globulos.

Os merozoitos, no interior dos globulos ou livres aparecem nas preparações fixadas e córadas com fórma quazi triangular; a fresco, porém, são arredondados e têm a cromatina excentricamente colocada.

Não conseguimos determinar o prazo da evolução esquizogonica, por aprezentar sempre o animal as mais variadas fórmas no sangue.

Os gametos do *Plasmodium diplogossi* se distinguem facilmente em machos e femeos.

Sua evolução no interior do globulo não é muito diversa da de uma forma esquizogonica. Elles, aos poucos, se expandem pelo protoplasma do globulo, cercam, deformando o nucleo, assim como hipertrofiam a celula. Est. 3, figs. 5, 10, 12 f e 13 d.

Os gametos femeos aprezentam um protoplasma denso em que se vêm disseminados numerozos pequenos granulos de pigmento, um pouco dezeguais, além de um ou outro vacuolo; o nucleo é reprezentado por massa de cromatina, maior, cercada, geralmente, de numerozos granulos menores. Não raro se vêm ainda, dispersos no protoplasma do gameto 2 ou 3 pequenas massas

lopment and forming a group in one point of the protoplasm. (Plate Fig. 12 c, e, f and 3 b.

The schizontes in a more advenced stage of development appear in the form of a mass of protoplasm full of chromatinfragments and with more pigment than in the former stages occupying all or nearly all the protoplasm of the red bloodcell. (Plate 3, fig. 7, 8, 9, 11 d, and 13 c).

The number of the chromatin granules in the stages figured there may exceed forty and each one corresponds to a future merozoite. (Fig. 11 d) After the dissolution of the schizont these infect new globules. In one of our dry slides. (Plate 3, Fig. 11 c) they were found free between the bloodcells, but in fresh preparations we could never observe the passage of the merozoites in the plasma or in other globules.

The endoglobular or free merozoites appear in fixed and stained preparations in nearly triangular shape but in fresh preparations they are rounded, with the chromatine excentrically located.

We could not determine the time employed in the schizogonic evolution because the different stages were all found at the same time.

The gametocytes and macrogametes of the *Plasmodium diploglossi* are easily distinguished. Their evolution inside of the globules is not very different from that of the schizogonic form. They expand gradually in the protoplasm of the bloodcells, enclose and deform the nucleus and produce the hypertrophy of the cell itself. (Plate 3, Fig. 5, 10, 12 f. 13 d).

The female gametes show a dense protoplasm containing numerous small and somewhat unequal pigmentgranules and also some vacuoles. The nucleus is represented by a

de cromatina, muito provavelmente produtos emanados do nucleo.

Os gametos femeos se distinguem dos machos pelo tamanho, que é menos avantajado, pelo protoplasma pouco denso e muito menos intensamente córavel, pela fina e abundante pigmentação e pelo nucleo, que é reprezentado por pequena massa arredondada, que constitue o centro, a partir do qual se irradiam, disseminando pelo protoplasma, pequeninas massas de cromatina que formam, em torno delle trama muito delicado.

No sangue examinado entre lamina e laminula ou em gota pendente, observa-se que, ao cabo de algum tempo os gametos tomam a forma esferica e que o pigmento começa a aprezentar movimentos que chegam a ser muito intensos, durante algum tempo no gameto macho; nunca, porém, observámos a emissão de flagelos, talvez porque as condições do meio não fossem favoraveis ao fenomeno, pois muito rapidamente cessava o movimento do gameto, indicio da diminuição de vitalidade.

Plasmodium tropiduri n. sp.

Este parazita só foi estudado até agora em preparados de sangue córados pelo Giemsa. Máo grado todos os esforços, não conseguimos, até agora, obter animais vivos, infetados para nelles estudar a evolução do parazita.

A disseminação da infeção nos tropiduros parece não ser muito vasta, pois, até agora, não encontrámos um só animal infetado, entre muitos provenientes do Rio, do Xérem, de Juiz de Fóra e S. Paulo, ao passo que em Bicudos, segundo nos afirmou o dr. Chagas, quazi todos os tropiduros estão infetados.

O *Plasmodium tropiduri* é parazita bem menor que o precedentemente descrito e, ao contrario delle aprezenta a maior semelhança morfolojica com os plasmodios do tipo proteozoma do sangue das aves.

Nos globulos infetados, os parazitas são quazi excluzivamente encontrados nas extremidades da celula e nesse ponto se processa toda evolução. Não raro, nos eritrócitos em que existem dous parazitas, cada um ocupa uma das extremidades.

larger mass of chromatin surrounded generally by other smaller ones. It is not very rare to observe two or three smaller chromatinmasses distributed in the cellplasm which are probably derived from the nucleus.

These microgametocytes are distinguished from the macrogametes by their smaller size, the less dense and paler protoplasm, the larger and less abundant pigmentgranules and by the conditions of the nucleus. It consists in a small rounded chromatinmass, forming the centre from which small chromatin particles radiate into the protoplasm in the shape of a delicate network.

In fresh preparations the gametocytes and macrogametes after some time take a spherical shape and shortly afterwards the pigment begins to show movements which in the former may become very intense. We could never observe the emission of flagella, perhaps because the conditions of the medium were not favourable, as the speedy diminution of the motility seemed to indicate.

Plasmodium tropiduri n. sp.

The *Plasmodium tropiduri* has been studied only in bloodsmears stained with Giemsa's fluid, as all our efforts to obtain living infected specimens of the host remained unsuccessfull.

The parasite does not seem to be very wide spread, as we could not find an infected individual amongst a great number of specimens from Rio de Janeiro, Xerem, Juiz de Fóra and São Paulo, while in Bicudos (State of Minas) Dr. Chagas found almost every individual infected.

This plasmodium is much smaller as the one previously described and, in contrast with it, shows the greatest ressemblance with the

Os globulos parazitados pelas formas mais dezenvolvidas do hematozoario aprezentam-se, geralmente, um pouco aumentados de volume e deformados, principalmente na extremidade em que se assesta o parazita. Tambem o nucleo não escapa á influencia do parazitismo e aprezenta-se, ás vezes, lijeiramente deformado.

As formas mais jovens deste plasmodio não se diferenciam muito das do anteriormente descrito; são reprezentadas por pequenos corpusculos arredondados ou em forma de anel, constituidos por diminuta porção de protoplasma córado em azul claro pelo Giemsa, tendo, ás vezes, vacuolo nutritivo e massa de cromatina excentricamente colocada. Est. 3, fig. 14.

Caracterizam faze mais adiantada na evolução do parazita, as fórmas um pouco maiores que as precedentes alongadas ou, então, quazi regularmente redondas e ainda sem indicios de segmentação nuclear. Est. 3, fig. 15.

As formas pertencentes ao ciclo esquizogonico, desde que um pouco mais dezenvolvidas começam a aprezentar o nucleo fragmentado, observando-se nellas pequenos granulos de pigmento.

Nenhum indicio de divizão mitozica se observa nos esquizóntes, nos quais o maximo de merozoitos pode atinjir a 12. São mais ou menos regularmente arredondados, e aprezentam-se constituidos por massa de protoplasma de contornos irregulares, tendo no interior pequenas massas de cromatina, em numero variavel, proporcional ao seu dezenvolvimento, até o maximo acima assinalado; o pigmento aparece nelles aglomerado em um ponto. O diametro das maiores formas mais dezenvolvidas não excede a 7 a 8 μ. Est. 3, figs. 16, 17, 18 e 19.

Quando o numero de merozoitos atinje ao maximo, acima citado, começa a segmentação do protoplasma, em torno de cada um e assim, constituem-se os merozitos destinados a infeção de novos globulos.

Os gametos do *Plasmodium tropiduri* se distinguem perfeitamente, nos preparados córados, pelos seus caracteres proprios em masculinos e femininos. Tanto uns, como outros

proteosoma of birds. In the infected globules the parasites are almost invariably found at the end of the bloodcells where the whole evolution is performed. It is not rare to find in the same globule two parasites, each of which occupies the opposite end of it.

The erythrocytes containing the larger forms are generally swollen and deformed, principially at the end where the parasite is located. The nucleus also sometimes shows the influence of the parasite by a slight deformation.

The younger stages of the plasmodium do not differ much from the forms described before, being small rounded or ringshaped bodies of protoplasm staining pale blue by Giemsa's method and showing sometimes a nutritive vacuole and an excentrically located chromatine mass. (Plate 3, Fig. 14).

A more advanced stage of the parasite is known by somewhat larger forms, either allongated or almost regularly rounded but not showing yet any indication of segmentation of the nucleus. (Plate 3, Fig. Fig. 15). Still later forms show fragmentation of the nucleus and small granules of pigment. There is no indication of mitosis in the schizogonic forms in which the maximum of merozoites may attain 12. They are more or less regularly rounded and constituted by a mass of protoplasm, including small masses of chromatin in varying number up to the maximum of twelve; the pigment is collected in one place anf their diameter does not exceed 7 to 8 mikra. (Plate 3, Fig. 17, 18, 19).

When the division of the chromatin is completed the segmentation of the protoplasm takes place forming the merozoites.

The microgametocytes and female gameses are easily distinguished by their aspect. The macrogametes show a very regular outline and measure 6-8 *mikra,* the protoplasma

são sempre encontrados nas extremidades das celulas, aplicados de encontro ao nucleo.

Os gametos femeos adultos têm a forma esferica muito regular, medem 7 a 8 μ de diametro; o protoplasma é denso, bastante homojeneo e córa-se em azul intenso pelo Giemsa. Em um ponto qualquer delle, geralmente na periferia se encontra o nucleo, reprezentado por diversas placas de cromatina reunidas umas ás outras, formando uma massa unica.

O pigmento se acha irregularmente distribuido por todo o parazita, sob fórma de pequenas massas arredondadas, de colorido pardo escuro. Est. 3, fig. 20.

Os gametos masculinos são, em geral, maiores que os femininos; não raro atinjem 9 μ de diametro, são arredondados como aquelles, porém não tão regularmente. O protoplasma córa-se muito fracamente em azul pelo Giemsa e o nucleo é constituido por delicado trama de bastonetes de cromatina que ocupa grande parte do protoplasma. O pigmento aparece sob fórma de pequenos blocos alongados, pouco numerozos distribuidos no protoplasma. Est. 3, fig. 21.

Os gametos macho e femeo, muito claramente distintos, quando completamente dezenvolvidos, já o são igualmente em periodo menos adiantado de evolução, se bem que menos nitidamente. Não têm então a forma arredondada e se parecem muito com as fórmas esquizogonicas; distinguem-se dellas, porem, pela prezença de nucleo unico e pela disseminação do pigmento no protoplasma.

As diferenças sexuais, si bem que igualmente menos acentuadas são já bastante patentes nelles.

being dense, homogeneous and intensely blue when stained by Giemsa's method. The nucleus is found in any place, mostly in the periphery, and constituted by several fragments of chromatin agglomerated in a single mass.

The pigment is irregularly distributed in the whole body forming small rounded masses of darkbrown hue. (Plate 3, Fig. 20).

The microgametocytes are generally larger than the female gamete attaining sometimes 9 *mikra*; their shape is less regularly rounded. The protoplasm stains a pale blue and the nucleus is formed by a few allongated chromatin masses, equally distributed in the cell plasm. (Plate 3, Fig. 21).

The two forms may be distinguished already in the less advanced periods though not quite as easily as in the adult stage. The earlier stages are not so regularly rounded and ressemble much the schizogonic forms. They are however recognized by the single nucleus and by the dissemination of the pigment. Both the forms are also found always in the ends of the bloodcells and near to the nucleus.

Literatura

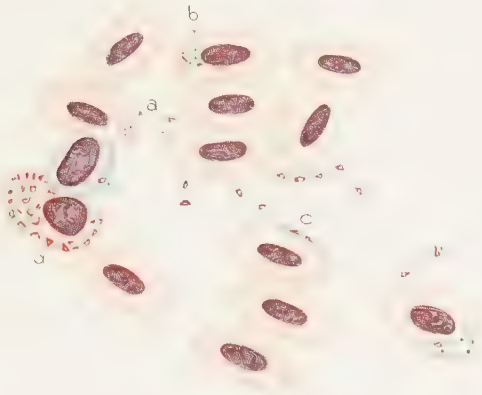
Dr. P. H. Simond, Contribution à l'étude des Hématozoaires endoglobulaires des Reptiles. Ann. Inst. Pasteur T. XV., 1901, p. p. 319, 350.

A. Castellani and A. Willeg, Spolia Zeylanica, Vol. II. Part. VI p. p. 84, 1904. Observations on the Haematozoa of Vertebrates in Ceylon.

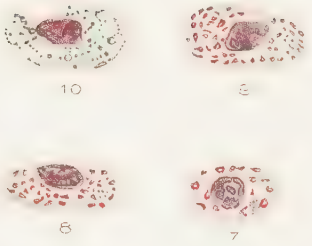
G. Bonet, Comp. Rend. de la Société de Biologie p. 43, 1904. Sur deux hémocytozoaires pigmentés des reptiles.

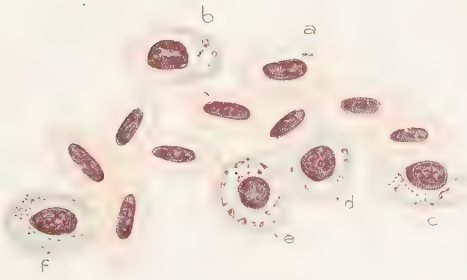
C. M. Wenyon. Report of Travelling Pathologist and Protozoologist. Third. Report of the Wellcome Besearch Laboratories at the Gordon Memorial College Khartoum 1908. Plasmodium mabuiae pag. 146. Pl. XII, fig. 1, 12, 4.

Id. Id. Hemocystidium najae, pag. 150. Pl. XIV, fig. 1, 17, 21. Pl. XV, fig. 4, 5, 6.

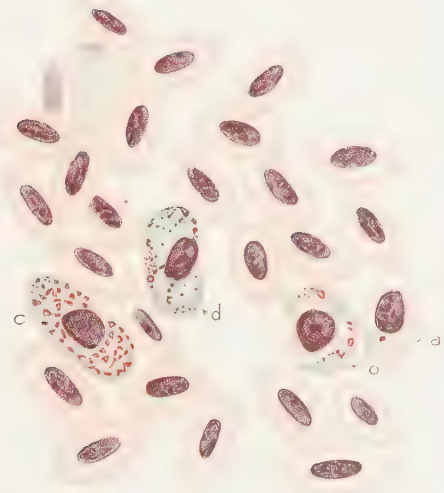


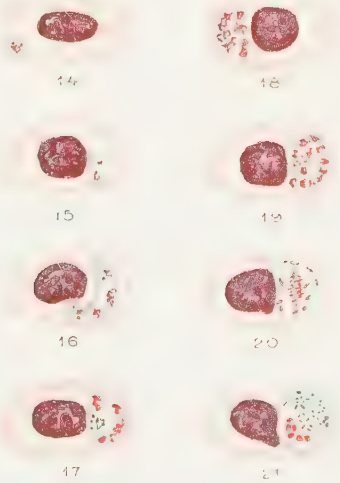
11





12





13

Estudos sobre a tuberculoze

pelo

Dr. A. Fontes,

Assistente no Instituto.

Etudes sur la tuberculose

par le

Dr. A. Fontes,

Assistent à l'Institut.

I

Introdução: Considerações gerais e sumarias sobre a terapeutica e imunidade da tuberculoze.

Auzencia de sôros especificos. Razões que a explicam. Toxinoterapia Reabsorção dos germens: por via venoza, por via linfatica (cazo particular da via intestinal). Imunidade natural para a tuberculoze; razões de ordem quimica que a explicam. Orientação seguida. Investigações sobre a natureza das cêras e gorduras extraidas do bacilo. Saponificação pelos alcooles — Fenomeno da acido rezistencia; diagnostico diferencial microscopico entre tuberculozos e pseudo tuberculozos. Estudo das granulações bacilares, sua eletividade para o Gram. Forma granular de Muchs como forma de rezistencia.

Existencia de fermento hidrolizante no ganglio tuberculozo — Extração do fermento — Diminuição do numero de bacilos da tuberculoze *in vitro* em virtude desse fermento — Saponificação da cêra dos bacilos por meio desse fermento.

O capitulo — Tuberculoze — em patolojia tem sido investigado quazi que sob todos os aspetos e, se é verdade que as conquistas da ciencia são nelle numerozas, não é menos real que muito pouco tem sido obtido em relação á terapeutica e á imunização. E' que aí, como geralmente se reconhece, intervem como fator de preponderancia quazi absoluta, o terreno em que evolve a infeção e que pela imperfeição dos metodos atuais de investigação, permanece enigma insoluvel, ocultando reações de ordem quimica que a razão

I

Introduction: Considérations générales et sommaires sur la thérapeutique et l'immunité de la tuberculose.

Manque de sérums spécifiques — Raisons qui l'expliquent. Toxinothérapie — Réabsorption des germes: par voie veineuse, par voie lymphatique (cas particulier de la voie intestinale). Immunité naturelle contre la tuberculose: Raisons d'ordre chimique qui l'expliquent. Orientation suivie. Recherches sur la nature des cires et des graisses extraites du bacille. Saponification par les alcalis — Phénomène de l'acide résistance; diagnostic differenciel microscopique entre les bacilles tuberculeux et les pseudo-tuberculeux. Etude des granulations bacillaires. Son électivité pour le Gram. Forme granulaire de Muchs comme forme de résistance.

Présence d'un ferment hydrolysant dans le ganglion tuberculeux — Extraction du ferment — Diminution du nombre des bacilles de la tuberculose *in vitro* en vertu de ce ferment — Saponification de la cire des bacilles au moyen de ce ferment.

Le chapitre — tuberculose — en pathologie a été considéré sous presque tous ses aspects, et si vraiment les conquêtes de la science sont à cet égard très nombreuses, il n'en est pas moins vrai qu'au point de vue de la thérapeutique et de l'immunisation les résultats obtenus n'ont pas été bien grands.

C'est qu'alors intervient comme facteur prépondérant, presque absolu, le terrain où évolue l'infection et qui, par l'imperfection des méthodes actuelles d'investigation, reste une énigme indéchiffrable, que cache des

prevê que se processam, tornando o meio improprio á vida do bacilo infetante.

De acôrdo com as belas conquistas da soroterapia na generalidade das infeções e por analojia dellas, tudo tem sido feito em relação á tuberculoze e, apoz um curto periodo de esperanças, tudo tem fracassado. Via que foi aberta pelas investigações de Richet e Hericourt, perlustrada mais tarde por Maragliano e Marmoreck, conta no entretanto numerozissimos colaboradores que, por premio só têm obtido a deziluzão lançada pela clinica.

A toxinoterapia, proposta por Koch, empregada hoje em dia com mais criterio, por ser melhor conhecida, daria rezultados absolutamente concludentes, se não existira um *quid* que os experimentadores não têm podido explicar e que consiste na faculdade do organismo tuberculozo reajir *beneficamente* á inoculação da tuberculina, faculdade que em determinados cazos, infelizmente raros, transformam a intervenção do medico em intervenção quazi milagroza. No emtanto o numero de cazos em que o tratamento não aproveita é grande e bastantes vezes são rejistados insucessos. Entra em ação o fator terreno, que quando modificado prepara o sucesso do tratamento especifico (regimen de sanatorios). Falta ás tuberculinas qualquer coiza que facilite seu mister terapeutico; as tuberculinas destróem o tecido tuberculozo; o bacilo, porém, permanece intato quando libertado.

O mesmo insucesso geral permanece no terreno das investigações sobre imunidade na tuberculoze. Desde as inoculações de culturas de bacilos acido-rezistentes banais ás de adenopatias escrofulozas até as injeções de culturas de tuberculoze atenuadas por numerozissimos processos, e entre esses, até aquelle que mais tem prendido a atenção dos especialistas, a bovo-vacina de Behring, quando muito mostram esses metodos a *possibilidade de se obter um aumento de rezistencia do organismo experimentado á inoculação de dóze de bacilos seguramente infetante.* A questão da via de introdução tem sido tambem

réactions d'ordre chimique que la raison nous permettra de prévoir, en rendant le milieu impropre à la vie du bacille infectant.

Encouragée par les belles conquêtes de la sérumthérapie dans la plupart des infections, et en employant des procédés analogues la médecine moderne a tout fait pour la tuberculose; mais, après une courte période d'espérances, tous les résultats ont été négatifs. Ces travaux commencés par les recherches de Richet et Héricourt, enrichis plus tard par Maragliano et Marmoreck, comptent cependant un grand nombre de collaborateurs qui n'ont recueilli que désillusion comme prix de leurs efforts.

La toxinothérapie, proposée par Koch et employée avec plus de soin aujourd'hui qu'elle est mieux connue, donnerait des résultats tout à fait concluants s'il n'y avait un *quia* que les expérimentateurs ne sont pas arrivés à expliquer; à savoir, la propriété qu'ont les organismes tuberculeux de réagir favorablement sous l'effet d'une inoculation de tuberculine; propriété qui, en de certains cas, malheuresement trop rares, transforment l'intervention du médecin en une intervention presque miraculeuse. Mais, l'effet du traitement ne se produit que rarement et l'on compte jusqu'aujourd'hui un grand nombre d'insuccès. Le facteur terrain entre en jeu; lorsqu'il est convenablement modifié, il prépare le succès du traitement spécifique (régime des sanatoriums). Il manque aux tuberculines un je ne sais quoi qui facilite leur action thérapeutique; elles détruisent le tissu tuberculeux, mais le bacille, reste intact, une fois libre.

Le même insuccès général se fait sentir sur le terrain des recherches sur l'immunité de la tuberculose. Si nous considérons les inoculations de cultures de bacilles banaux résistants aux acides jusqu'à celles d'adénopathies scrofuleuses et de cultures de tuberculose atténuées par de nombreux procédés, parmi lesquels celui qui a le plus attiré l'attention des spécialistes, la bovo-vaccine de Behring, nous verrons que ces méthodes prouvent tout au plus la possibilité d'obtenir une augmentation de résistance de l'organisme, soumis à l'inoculation d'une dose de bacilles sûrement infectante. La

explorada; via intra-venoza (Behring), via intestinal (cazo particular da via linfatica) (Calmette), têm dado rezultados que, no emtanto, mostram sempre que a reabsorção do bacilo não se faz facilmente e que na maioria das vezes ella não se observa, permanecendo os bacilos intatos. Isto explica o insucesso da soroterapia ainda que incluidos na celula fagocitaria.

E a razão desse fenomeno existe na estrutura quimica do bacilo, na prezença nelles de substancias que não são assimilaveis normalmente e que protejem o *substratum* vital do germen contra as substancias que o organismo deveria secretar, reajindo assim á infeção, destruindo o elemento invasor.

E' a camada cérea, são os corpos de natureza graxa que existem no microbio da tuberculoze que se opõem á destruição do bacilo; sua função protetora nos é cabalmente revelada pelos metodos de coloração especiais aos acidos rezistentes; junte-se essa função que proteje o bacilo a ganga de hidroceluloze, os toxicos por elle fabricados e cuja natureza complexa tem sempre escapado ás investigações dos observadores, e veremos a razão da produção da celula gigante com todos os carateristicos da lezão tuberculoza reveladas no tuberculo microscopico.

Encarada a essa luz, a infeção tuberculoza se nos aprezenta como molestia local, como a afeção de um orgão. Nelle se devem passar as reações de defeza e isso nol-o mostra não só a clinica, como a experimentação, revelando-nos, de todas as reações a mais facilmente apreciavel — a conjestão peri-tubercular. E' este o primeiro estado do processo de necroze do tuberculo que terminará pela eliminação do tecido morto transformado em puz. A tuberculoze mata pela destruição do tecido nobre do orgão; a terapeutica da tuberculoze deve consistir na destruição do bacilo no interior da celula doente.

Entretanto a infeção tuberculoza é na maioria dos cazos espontaneamente paralizada e frequentes vezes curada, excluzivamente á custa do organismo infetado. E' banal:

question de la voie de l'inoculation a été aussi étudiée: Voie intraveineuse (Behring), voie intestinale (cas particulier de la voie lymphatique), (Calmette) ont donné des résultats prouvant toujours que la résorption du bacille ne se fait pas facilement et qu'on ne l'observe pas le plus souvent: les bacilles demeurent intacts, même inclus dans la cellule phagocytaire. C'est ce qui explique l'insuccès de la sérumthérapie. La raison de ce phénomène provient de la structure chimique du bacille, de la présence en lui de substances qui ne sont pas normalement assimilables et qui protègent le *substractum* vital du germe contre les substances que l'organisme devrait sécréter, de sorte qu'il réagit contre l'infection et que l'élément envahisseur est détruit.

C'est la couche cireuse, ce sont les corps gras du baclle de la tuberculose qui s'opposent à sa destruction; sa fonction protectrice nous est clairement révélée par les méthodes spéciales de coloration résistantes aux acides; ajoutez à cette fonction qui protège le bacille, les toxiques qu'il fabrique, la gangue d'hydrocellulose qui l'enveloppe et dont la nature complexe a toujours échappé aux investigations des observateurs, et nous comprendrons la raison de la production de la cellule géante, avec tous les signes caractéristiques de la lésion tuberculose révélés dans le tubercule microscopique.

Considérée à ce point de vue, l'infection tuberculeuse nous apparait comme une maladie locale, comme l'affection d'un organe. Celui-ci doit présenter des réactions de défense, qui nous sont d'ailleurs révélées par la chimie et l'expérimentation, grâce auxquelles nous observons la réaction la plus facile à observer: la congestion péritubercul aire.

C'est là le premier stage du procédé de la nécrose du tubercule, qui se terminera par l'elimination du tissu mort et sa transformation en pus. La tuberculose tue par la destruction du tissu noble de l'organe; la thérapeutique de la tuberculose doit consister dans la destruction du bacille à l'interieur de la cellule malade.

Toutefois, dans la plupart des cas, la tuberculose est paralysée spontanément et souvent même guérie, rien qu'aux dépens de l'organis-

frase a de todas as infeções é a tuberculoze a mais curavel —, e as autopsias confirmamna sempre. E' que o organismo reaje á infeção por dois processos de cura: pela escleroze do tuberculo ou pela calcificação delle. A evolução da lezão mostra comtudo que a escleroze precede sempre á calcificação. A analize dos tuberculos calcificados mostra que os sais de calcio, fosfato e a cal em natureza se depositam sobre o bacilo em camadas concentricas que o tem por nucleo, abundando no interior desses tuberculos cristais de natureza graxa.

Muitas vezes não se pode mais revelar a existencia de bacilos no interior dos tuberculos calcificados, sinal evidente de sua destruição. A ação esclerojena corre por conta dos toxicos bacilares (ação de tuberculina de Koch; produtos esclerojenos extraidos do bacilo, cloroformobacilina de Auclair), a reação calcificante corre por conta das substancias não reabsorviveis do bacilo (cêras e gorduras) conforme pensamos.

Foi nesse sentido que dirijimos nossas investigações, de acôrdo com a orientação que nos foi fornecida por G. Cruz, nosso mestre.

Suas primeiras experiencias (1900) vizaram obter a reabsorção do bacilo, imunizando os animais por via subcutanea, primeiramente contra as gorduras animais (oleo de figado de bacalháo e gordura humana) mais tarde com as gorduras extraidas do bacilo. Verificou então que se essa reabsorção se dava, era de tal modo lenta que, praticamente, podia ser considerada como não existindo.

De acôrdo com essa verificação poderiamos tentar a reabsorção dos bacilos com o fim de imunização, utilizando-nos da via intestinal, segundo a doutrina de Calmette, rezultado que seria obtido com a saponificação desses corpos pelos sucos pancreaticos, especialmente pela esteapsina, como mostraram Lewkowitsch e Macleod, pelos sais biliares, e talvez ainda pela lipaze do sangue, como se dá com a monobutirina, como rezulta das investigações de Victor Hanriot. Isso entretanto não sucede porque as gorme infecté. «De toutes les infections, la plus facilement guérissable est la tuberculose». C'est, la phrase bien connue, et toujours confirmée par les autopsies. C'est que l'organisme réagit de deux manières contre l'infection: par la sclérose du tubercule ou par sa calcification. L'évolution de la lésion montre, cependant, que la sclérose précède toujours la calcification.

L' analyse des tubercules calcifiés nous prouve que le phosphate de chaux et la chaux en nature se déposent sur le bacille en couches concentriques dont il constitue le noyau; l'intérieur de ces tubercules abonde en cristaux de nature graisseuse.

Souvent on ne peut plus vérifier l'existence de bacilles à l'intérieur des tubercules calcifiés, preuve évidente de leur destruction. L'action sclerogène est attribuée aux toxiques bacillaires (action de la tuberculine de Koch; produits sclérogènes extraits du bacille: chloroformobacilline d'Auclair). La réaction calcifiante est produite, selon nous, par les substances du bacille qui ne se peuvent résorber (cires et graisses). C'est dans ce sens que nous avons dirigé nos recherches, en suivant l'orientation qui nous a été fournie par notre maître G. Cruz.

Dans ses premières expériences, réalisées en 1900, il avait cherché à obtenir la résorption du bacille en injectant les animaux par voie sous-cutané, d'abord avec des graisses animales (huile de foie demorue et graisse humaine) plus tard au moyen des graisses extraites du bacille. Il vérifia alors que cette résorption s'effectuait avec une telle lenteur qu'elle pouvait être considérée pratiquement nulle.

Nous pourrions, en vue de cette vérification, tenter la résorption des bacilles, dans un but d'immunisation, en nous servant de la voie intestinale, selon la doctrine de Calmette, résultat qu'on obtiendrait par la saponification de ces corps par les sucs pancréatiques, en particulier par la stéapsine comme l'ont montré Lewkowitsh et Macleod, par les sels biliaires et peut-être encore par la lipase du sang, comme il arrive avec la monobutyrine, comme on le déduit des investigations de V. Hanriot. Cela n'arrive pourtant pas, parce que les graisses ont leurs ferments spécifiques (Fischer, Pawlow).

duras tem seus fermentos especificos (Fischer, Pawlow).

De acôrdo com essa orientação impunha-se o conhecimento exato da natureza quimica das substancias gordurozas existentes no bacilo da tuberculoze e que de ha muito serviam para explicar o fenomeno da acido-rezistencia que era atribuido unicamente a ellas.

Hammerschlag, no emtanto, já em 1889 reconhecera que no bacilo da tuberculoze existe substancia de natureza albuminoide que possue a propriedade de rezistir aos acidos, quando corada. Modernamente, Auclair e Paris provaram que a acido-rezistencia é fenomeno complexo dependente da acido-rezistencia parcial de diversos componentes do corpo do bacilo.

Com o objetivo de reconhecermos a natureza dessas gorduras procedemos em um aparelho de Sohxlet ao esgotamento de bacilos da tuberculoze esterilizados pelo calôr e secos, tratando-os, sucessivamente, pelos seguintes dissolventes das gorduras: xilol, alcool a 95º, eter e cloroformio. Os bacilos colocados entre duas camadas de algodão de vidro eram sujeitos á ação dos dissolventes, na ordem acima indicada até que se não obtivesse reziduo pela evaporação de 10cc do dissolvente empregado e que era colhido acima do algodão de vidro, e até o ensaio de Lightfood (ensaio de canfora) mostrar-se negativo. Os produtos obtidos apoz o esgotamento eram filtrados em véla de porcelana e os reziduos bacilares examinados ao microscopio. Esses reziduos bacilares permanecem acido-rezistentes até final tratamento pelo cloroformio; o aspeto, porém, dos bacilos modifica-se, aprezentando-se elles mais finos e mais granulozos, como se tivera havido perda de substancias existentes no corpo microbiano intermediarios d'aquellas granulações.

Dos produtos extraidos pelo xilol, um é precipitavel pelo alcool absoluto em excesso. Aprezenta-se sob o aspeto de substancia pulverulenta, branco-amarelada.

Esse precipitado colhido sobre um filtro

Nous avions donc à rechercher quelle était exactement la nature chimique des substances grasiseuses contenues dans le bacille de la tuberculose, lesquelles servaient depuis longtemps à expliquer le phénomène de la résistence aux acides qui leur était exclusivement attribuée.

Cependant, en 1889, Hammerschlag avait déjà vérifié qu'il existe dans le bacille de la tuberculose une substance de nature albuminoide qui possède la propriété de résister aux acides, quand elle est colorée. De nos jours, Auclair et Paris ont prouvé que la résistance aux acides est un phénomène complexe, qui dépend de la résistance partielle aux acides de plusieurs composants du corps du bacille.

Dans le but de reconnaître la nature de ces graisses, nous avons égoutté dans un appareil de Sohxlet les bacilles de la tuberculose stérilisés par la chaleur et secs, en les traitant successivement par les dissolvants qui suivent: xylol, alcool à 95º, éther et chloroforme. Les bacilles placés entre deux couches d'ouate de verre étaient soumis à l'action des dissolvants, dans l'ordre ci-dessus mentionné, jusqu'à ce qu'on n'obtins plus de résidu par l'évaporation de 10 cc. du dissolvant employé et qui était recueilli sur l'ouate de verre, et que l'essai de Lightfood (essai du camphre) donnât un résultat négatif. Les produits obtenus après l'égouttement étaient filtrés à travers une bougie de porcelaine et les résidus bacillaires examinés au microscope. Ces résidus se conservent résistants aux acides jusqu'au traitement final par le chloroforme; mais l'aspect des bacilles se modifie, ils deviennent plus minces et plus granuleux, comme s'il y avait eu une perte dans le corps microbien de substances intermédiaires entre ces granulations.

L'un des produits extraits par le xylol donne un précipité, avec l'alcool en excès. Ce précipité a l'aspect d'une substance pulvérulente, d'un blanc jaunâtre; une fois recueilli sur un filtre et traité par l'éther, il se dissout en partie; il reste sur le filtre un résidu insoluble dans le chloroforme.

Si l'on examine au microscope le précipité obtenu de la façon ci-dessus décrite, il appa-

e tratado pelo eter dissolve-se em parte; sobre o filtro permanece um reziduo insoluvel no eter e soluvel no cloroformio.

O precipitado obtido como acima dissemos, examinado ao microscopio aprezenta-se como constituido por pequenos granulos refrinjentes (Obj. C e E, Zeiss Oc. 3). Córase pelo Ziehl e reziste aos acidos. E' insoluvel na agua destilada, agua alcalinizada e alcool, quer a frio, quer nos respetivos pontos de ebulição. Decompõe-se pelo tratamento com o acido azotico ao terço, fervente, dando produção de gorduras reconheciveis pelo *Sudão.*

A saponificação dessa substancia pela soda alcoolica mostrou tratar-se de uma cêra em cuja constituição entra um alcool izomero da colesterina, porém diferente da izocolesterina e fitosterina.

A separação da porção soluvel no eter da que é soluvel no cloroformio mostra, pela evaporação dos referidos veiculos dois produtos de aspeto diverso: branco-amarelado a porção soluvel no eter, mais escura a porção soluvel no cloroformio. A primeira é uma cêra, a segunda não poude ainda ser caraterizada, dada a pequena quantidade obtida. Esses dois produtos diferem ainda pelo ponto de fuzão. A cêra soluvel no eter funde a 54,°5 C, o produto soluvel no cloroformio tem para ponto de fuzão 193º C.

O xilol de onde fôra precipitada a cêra pelo alcool absoluto, libertado desse alcool e tratado pela agua, deixa precipitar uma substancia soluvel no eter. Pela evaporação desse dissolvente, cristaliza em tufos de agulhas sedozas. E' saponificavel pela soda alcoolizada e sendo fundida em estado cristalino aprezenta-se, apoz a fuzão, sob o aspeto de massas escamozas, nacaradas. A cristalização indica acido palmitico. Si em vez de tratarmos pela agua evaporarmos o xilol em B. M. obter-se-á um produto, que, pelo resfriamento se solidifica com aspeto gordurozo, de côr amarela avermelhada. Tem o cheiro de tuberculina um pouco alterado aproximando-se do cheiro de mel de abelhas e

rait comme constitué par de petits granules réfringents (Obj. C e E, Zeiss oc. 3). Il se colore sous l'action du Ziehl, résiste aux acides et reste insoluble dans l'eau distillée, l'eau alcoolisée et l'alcool, soit à froid, soit à leur point d'ébullition. Il se décompose sous l'action de l'acide azotique au tiers, bouillant, et produit alors des graisses reconnaissables par le *Soudan.*

La saponification de cette substance par la soude alcoolique a montré qu'il s'agissait d'une cire dans la constitution de laquelle il y a un alcool isomérique de la cholestérine différent, toutefois, de l'isocholestérine et de la phytostérine.

La séparation de la partie soluble dans l'éther d'avec celle qui est soluble dans le chloroforme nous montre, par l'évaporation des véhicules deux produits d'aspect différent: la partie soluble dans l'éther laisse un résidu blanc jaunâtre; le résidu de l'autre partie est plus foncé. La premier est une cire; quant au second, la quantité obtenue est si petite qu'on n'a encore pu la determiner. Ces deux produits diffèrent encore par leur point de fusion. La cire soluble dans l'éther fond à 54,º5 C.; le point de fusion du produit soluble dans le chloroforme est 193º C.

Le xylol, d'où la cire a été précipitée par l'alcool absolu, une fois dêlivré de cet alcool et traité par l'eau, laisse précipiter une substance soluble dans l'éther. Par l'évaporation de ce dissolvant, elle cristallise en touffes d'aiguilles soyeuses et peut être saponifié par la soude alcoolique; une fois fondu à l'état cristallin, elle se présente, après la fusion, sous l'aspect de masses écaillées et nacrées. Sa cristallisation indique un acide palmitique. Si, au lieu de le traiter par l'eau, on fait évaporer le xylol en B. M. on obtient un produit qui, en se refroidissant, se solidifie et prend l'aspect d'un corps gras, d'un jaune rougeâtre. Il a une odeur de tuberculine un peu alterée, qui rappelle le parfum du miel et a une saveur âcre très prononcée. Il fond à 53º5, se solidifie à 52º C. et est soluble dans les dissolvants des graisses. L'épreuve de Lightfood donne un résultat positif, et ne révèle pas la présence de graisses dans les autres dissol-

sabôr acre muito pronunciado. Funde a 53o5, e solidifica-se a 52o C; é soluvel nos dissolventes das gorduras. O ensaio de Lightfood dá rezultado pozitivo. Esse mesmo ensaio não revela gorduras nos outros dissolventes empregados (alcool, eter e cloroformio). O cloroformio extrae dos bacilos uma lecitina precipitavel pela agua.

Retomando os bacilos desengordurados e córando-os pelo metodo de Ziehl verificamos que permanecem acido-rezistentes o que está de acôrdo com o que tinha sido observado por Auclair e Paris. Isto nos levou a investigar um metodo de coloração diferencial entre os bacilos da tuberculoze e os pseudo-tuberculozos. Entre estes a acido-rezistencia é tambem relativa e varía, desde o tempo de cultura, até a orijem do bacilo estudado. A dificuldade consistia, pois, em encontrarmos um ajente descorante capaz de produzir os seus efeitos sobre os para-tuberculozos, poupando o bacilo da tuberculoze verdadeira. Outro caminho seria acharmos uma materia corante eletiva que os diferenciasse nitidamente.

Si apoz a ação descorante da mistura de alcool absoluto 1 parte e acido acetico 2 partes fizermos o Gram sobre o preparado, os bacilos paratuberculozos tomarão intensamente a côr bazica, aprezentando volumozas granulações condensadas. Os bacilos da tuberculoze se comportam de maneira diversa; conservar-se-ão corados em vermelho e, as granulações intensamente coradas pelo violeta de genciana, aprezentar-se-ão esparsas. Córando um preparado de tuberculoze e de pseudo-tuberculoze pelo Ziehl e descorando-o rapidamente por uma solução acida (acido azotico ao terço, acido sulfurico ao quarto) si o tratarmos por uma solução aquoza de azul de metilenio e si fizermos sobre esta ajir uma solução de acido picrico, o azul precipitará sob forma cristalina.

Esses cristais são soluveis na agua, pouco soluveis no alcool etilico e bastante soluveis no alcool metilico. Si examinarmos então o preparado veremos que os bacilos se-aprezentam mais descorados em relação

vants employés (alcool, éther et chloroforme). Le chloroforme extrait des bacilles une lécithine qui donne avec l'eau un précipité.

En reprenant les bacilles privés maintenant de graisse et en les colorant par la méthode de Ziehl, nous vérifions qu'ils se conservent résistants aux acides, ce qui est d'accord avec les observations d'Auclair et Paris. Cela nous a conduits à chercher une méthode de coloration différentielle entre les bacilles de la tuberculose et les pseudo-tuberculeux. Parmi ceux-ci, la résistance aux acides est aussi relative et varie dès le temps de culture jusqu'à l'échantillon du bacille étudié. La difficulté consiste donc à trouver un agent décolorant capable de produire son effet sur les paratuberculeux, tout en épargnant le bacille de la vraie tuberculose. Nous pourrions aussi tâcher de trouver une matière colorante élective qui les différentie nettement.

Si, après l'action décolorante du mélange de 1 partie d'alcool absolu et 2 parties d'acide acétique sur une préparation colorée par le Ziehl nous faisons le Gram, les bacilles paratuberculeux prendront entièrement la couleur violette, en présentant de volumineuses granulations condensées. Les bacilles de la tuberculose se comportent d'une façon différente. Ils conservent la couleur rouge, et les granulations fortement colorées par le violet de gentiane, apparaitront disséminées. En colorant une préparation de tuberculose et de pseudo-tuberculose par le Ziehl et en la décolorant rapidement par une solution acide (acide azotique au tiers, acide sulfurique au quart) et si nous la traitons par une solution aqueuse de bleu de methylène dans laquelle verse une solution d'acide pricrique, le bleu se deposera sous la forme cristalline. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool ethylique et assez solubles dans l'alcool methylique. Si nous examinons alors la préparation, nous verrons que les bacilles se présentent plus décolorés, par rapport au Ziehl, qu'avant l'action de l'acide picrique et que, parmi les pseudo-tuberculeux, quelques uns apparaissent colorés en violet. On comprend que l'acide picrique ait provoqué une décoloration plus énergique, non

ao Ziehl que antes da ação do acido picrico e que os pseudo-tuberculozos se aprezentam alguns córados em violeta. Compreende-se que o acido picrico tenha determinado esse descoramento mais enerjico, não só por sua função de acido, como por deslocar o Cl da molecula do azul de metilenio.

Restava investigar si o picrato de azul de metilenio precipitado possuia propriedade de coloração eletiva para os pseudo-tuberculozos.

A mistura da solução de Ziehl e emulsão concentrada em glicerina e agua do picrato de azul de metilenio, aprezenta a particularidade interessante de córar a quente em vermelho, especificamente, os acido-rezistentes (tuberculoze ou pseudo-tuberculoze) ao passo que o nucleo das celulas do material examinado e os outros bacterios que ahi possam existir (caso particular do escarro) coram-se em violeta. O protoplasma das celulas conserva-se rozeo. A diferenciação faz-se pelo alcool-acetona.

O tratamento pelo Lugol, apoz a ação da mistura acima referida, parece modificar as condições de coloração do preparado. Conseguimos, assim, o descoramento completo de algumas amostras de pseudo-tuberculoze apoz a ação do Lugol e alcool-acetona. Nessas condições a tuberculoze conserva-se vermelha com granulações violetas, todo o resto da preparação descora-se dando lugar a que se proceda á coloração do fundo por qualquer côr de contraste.

Melhor rezultado observámos, porém, uzando em vez do picrato de azul de metilenio, o cristal violeta ou a violeta de genciana fenicados. Essas côres aprezentam um gráo maior de eletividade para as granulações dos bacilos.

Esse metodo nos deu magnificos rezultados, trazendo real vantajem no diagnostico diferencial. O alcool-acetona, que é o descorante empregado, mostra-se capaz de libertar os pseudo-tuberculozos da fucsina, ao passo que os tuberculozos verdadeiros a conservam, aprezentando-se córados em vermelho. As granulações coradas em violeta contrastam

seulement parcequ'il agit comme acide mais aussi il sépare le Cl de la molécule du bleu de methylène.

Il restait à voir si le picrate du bleu de methylène, une fois précipité, possédait la propriété de coloration élective vis à vis des pseudo-tuberculeux.

Le mélange de la solution de Ziehl avec l'émulsion concentrée du picrate de bleu de methylène en glycérine et eau présente l'intéressante particularité de colorer en rouge, à chaud, spécifiquement, les bacilles résistants aux acides (tuberculose ou pseudo-tuberculose) tandis que le noyau des cellules du matériel examiné et les autres bactéries qui peuvent par hasard s'y trouver (cas particulier du crachat) se colorent en violet. Le protoplasme des cellules conserve une teinte rosée. La differentiation s'établit par l'alcool-acétone.

Le traitement par le Lugol, après l'action du mélange dont nous venons de parler, semble modifier les conditions de coloration de la préparation. Nous avons obtenu ainsi la décoloration complète de quelques échantillons de pseudo-tuberculose sous l'action du Lugol et de l'alcool-acétone. Dans ces conditions, la tuberculose reste rouge, avec des granulations violettes; tout le reste de la préparation se décolore, en permettant la coloration du fond, par une couleur quelconque.

Nous avons obtenu un meilleur résultat en employant au lieu du picrate de bleu de méthylène le cristal violet ou le violet de gentiane phéniqués. Ces couleurs ont une plus grande force d'électivité pour les granulations des bacilles.

Cette méthode nous a donné des très beaux résultats, en produisant un réel avantage dans le diagnostic différentiel. L'alcool acétone, qui est le décolorant employé, est capable de faire disparaître la fuchsine des pseudo-tuberculeux, tandis que les vrais tuberculeux la conservent, et présentant une couleur rouge. Les granulations colorées en violet ressortent admirablement à l'intérieur des bacilles. Le bleu de méthylène est très bon pour la coloration du fond.

En un mot, nous proposons la méthode suivante comme la meilleure pour la différen-

admiravelmente no interior dos bacilos. O azul de metilenio presta-se muito bem para a coloração do fundo.

Propomos, em rezumo, como metodo de escolha na diferenciação microscopica entre os bacilos da tuberculoze e os pseudo-tuberculozos, o seguinte:

A) Córar a quente pela fucsina fenicada de Ziehl, cerca de 2 minutos.
Lavar em agua corrente.

B) Córar pelo cristal violeta fenicado, durante 2 minutos.

C) Tratar pelo Lugol.

D) Descorar pela mistura:
Alcool absoluto 2 partes.
Acetona 1 parte.
Lavar — Córar por uma côr de contraste (azul de metilenio em solução aquoza).

As soluções uzadas em A e B podem ser empregadas em um só tempo, sendo misturadas em partes iguais. As preparações assim feitas são, no entretanto, menos nitidas.

Os bacilos da tuberculoze aprezentam-se *córados em vermelho,* mostrando em seu interior *granulações esparsas,* intensamente coradas em violeta.

Os paratuberculozos aprezentam-se *córados em violeta sem orla vermelha,* mostrando granulações *condensadas.*

Os microbios de associação (escarro, puz, etc.): pneumococos, stafilococos, streptococos, etc. tomarão o Gram e os outros serão revelados pela côr de contraste (azul de metilenio). O mesmo sucederá aos elementos constituintes do material examinado.

Acabamos de ver que, si tratarmos o bacilo da tuberculoze em condições adequadas pelo metodo de Gram suas granulações aprezentam a propriedade de reter enerjicamente a materia córante. Si em preparados córados a quente pelo Ziehl e assim fortemente impregnados empregarmos o Gram, mesmo sem lavajem da lamina para a retirada do excesso de fucsina, as granulações aprezentar-se-ão intensamente córadas em violeta.

tiation microscopique entre les bacilles de la tuberculose et les pseudo-tuberculeux:

A) Colorer à chaud par la fuchsine phéniquée de Ziehl, deux minutes environ.
Laver dans l'eau courante.

B) Colorer par le cristal violet phéniqué, pendant 2 minutes.

C) Traiter par le Lugol.

D) Décolorer par:
Alcool absolu 2 parties.
Acétone 1 partie.
Laver — Colorer avec une couleur de contraste (bleu de méthylène en solution aqueuse).

Les solutions dont on se sert pour A et B peuvent être employées en même temps, mélangées, en parties égales; mais les préparations sont, en ce cas, moins nettes.

Les bacilles de la tuberculose auront une *coloration rouge,* avec, à l'interieur, des granulations fortement colorées en violet.

Les para-tuberculeux apparaissent *colorés en violet,* et montrent des granulations condensées.

Les microbes d'association (crachat, pus, etc.): pneumocoques, staphylocoques, streptocoques etc. prendront le Gram et les autres seront révélés par la couleur de contraste (bleu de méthylène). Il en sera de même pour les éléments constitutifs du matériel examiné.

Nous venons de voir que si nous traitons le bacille de la tuberculose dans des conditions adéquates, par la méthode de Gram, ses granulations présentent la propriété de retenir énergiquement la matière colorante. Si, dans des préparations colorées à chaud par le Ziehl et, par suite, fortement teintées, nous employons le Gram, même sans laver, pour retirer l'excès de fuchsine, les granulations apparaitront entièrement colorées en violet. Il en sera de même si cette coloration est faite en sens inverse: les granulations se colorent en violet et le reste du bacille en rouge. Cette séconde méthode ne donne cependant pas des préparations aussi nettes que la première. Il en sera de même si nous faisons le mélange des matières colorantes sur la lame, colorée à chaud, après l'action du Lugol si nous faisons la décoloration par l'alcool absolu ou l'alcool acétone.

leta. O mesmo sucederá si essa coloração fôr feita em sentido inverso: as granulações córam-se em violeta e o resto do bacilo em vermelho. Esse segundo modo de proceder não dá, comtudo, preparações tão nitidas quanto o primeiro. O mesmo sucederá ainda, si fizermos a mistura das materias corantes e sobre a lamina córada a quente, apoz a ação do Lugol descorarmo-la pelo alcool absoluto ou alcool acetona.

Por outro lado, si em preparações córadas pelo Ziehl fizermos ajir rapidamente o cristal violeta, nem todas as granulações tomam a materia corante; vêm-se, então, no corpo do bacilo, intensamente córado em vermelho, pontos refrinjentes, brilhantes, que reprezentam as granulações não córadas. Infere-se disso que essas granulações tem maior eletividade para a materia corante do metodo de Gram do que para a fucsina e que não se trata de uma superpozição de côres e sim de uma propriedade eletiva.

Um outro argumento rezulta da observação de espaços menos córados nos bacilos coloridos só pelo Ziehl e que antigamente eram considerados diversamente como esporios ou como vacuolos.

Nas culturas homojeneas de tuberculoze onde a biolojia do bacilo é fortemente modificada, em virtude de adaptação forçada a essa nova condição de vida, as granulações prestam-se muito para estudo, especialmente nas formas ramozas ou actinomicozas.

Aprezentam-se aí como granulos (oc. comp. 12, Zeiss) incluidos em um espaço bem limitado, de contornos nitidos. Á's vezes fazem saliencia no limite externo do bacilo, como se devessem em breve ser espulsos, o corpo do bacilo aprezenta-se mais grosso e a substancia que se córa em vermelho e que envolve diretamente o granulo mostra-se mais delgada; entre elle e o corpo bacilar nota-se pequena orla clara.

O numero dessas granulações varia de 1 a 6 em cada bacilo; raras vezes atinge a 8 ou a 10, o que sómente observamos em culturas homojeneas de mais de mez. Quando unica, aprezenta-se geralmente no centro do

D'un autre côte si nous faisons agir rapidement le cristal violet sur des préparations colorées par le Ziehl, toutes les granulations ne souffrent pas l'effet de la matière colorante; on voit alors dans le corps du bacille entièrement coloré en rouge, des points réfringents, brillants, qui sont les granulations non colorées. On en déduit que ces granulations ont une plus grande électivité pour la matière colorante de la méthode de Gram que pour la fuchsine et qu'il ne s'agit pas d'une superposition de couleurs, mais bien d'une propriété élective.

On tire un nouvel argument de l'observation des parties moins colorées chez les bacilles colorés uniquement par le Ziehl et qui étaient autrefois considérées, soit comme des spores, soit comme des vacuoles.

Dans les cultures homogènes de tuberculose, où la biologie du bacille est profondément modifiée, en vertu de son adaptation forcée à cette nouvelle condition d'existence, les granulations servent bien mieux à l'étude, surtout s'il s'agit des formes ramifiées ou actinomycosiques.

Elles se présentent, alors, comme des granulations (oc. comp. 12, Zeiss) occupant un espace bien délimité, aux contours nets. Elles forment parfois saillie dans le corps du bacille, comme si elles devaient bientot en être expulsées; le corps du bacille est plus gros, et la substance qui se colore en rouge et entoure directement le granule, plus mince; on peut voir un petit ourlet clair entre elle et le corps du bacille.

Le nombre de ces granulations varie de 1 à 6 par bacille; il n'atteint que rarement 8 ou 10, ce qu'on n'observe, d'ailleurs, que dans les cultures homogènes de plus d'un mois. Lorsqu'elle est unique elle apparait, généralement, au centre du bacille ou à l'un de ses pôles; quand il y en a deux, chacune occupe, en général, l'une des extrémités du bacille; dans les autres cas, elles se disposent en série, rectiligne ou infléchie, selon le plan d'orientation du bacille.

Dans les formes bacillaires désagrégées — comme on l'observe aussi dans des cultures anciennes — les granulations se présentent

bacilo ou em um dos seus pólos; quando duas ocupa geralmente cada uma, um dos pólos do bacilo; nos outros cazos dispõem-se em serie retilinea ou incurvada, seguindo o plano de orientação do bacilo.

Nas formas bacilares dezagregadas, como sucede observar-se em culturas antigas, as granulações aprezentam-se, ás vezes, dispostas umas em seguimento ás outras, como streptococos, outras vezes esparsas, izoladas.

Nas culturas recentes em batata, na tuberculoze virulenta, modifica-se o aspeto dessas granulações que se mostram muitissimo menores. O mesmo se observa, fazendo-se seu estudo comparativo nos escarros de individuos não cavernozos e no dos tuberculozos antigos, cavitarios.

Essa diferença é mais sensivel nos escarros de tuberculozos sujeitos ao tratamento pela tuberculina, por muito tempo. Nestes ultimos chega-se mesmo a não se encontrar mais bacilos revelaveis pelo Ziehl, ao passo que as granulações raramente faltam e a inoculação na cobaia revela a existencia de tuberculoze.

O mesmo sucede no puz tuberculozo, como no cazo dos abcessos frios e a forma granular recentemente descrita por Muchs encontra nisso a sua explicação. Daí o inferir-se ser a forma granular, senão forma de rezistencia caracteristica, pelo menos a forma de maior rezistencia que o bacilo da tuberculoze possa tomar.

A auzencia de bacilos da tuberculoze caraterizaveis pelo Ziehl no puz dos abcessos tuberculozos; a existencia no puz tuberculozo de granulações e de bacilos revelaveis pelo metodo de Gram e a eletividade das granulações do bacilo para esse metodo de coloração, foram razões que determinaram verificassemos si nos ganglios tuberculozos havia formação de uma substancia capaz de modificar a estrutura do bacilo da tuberculoze ou mesmo de destruil-o.

Com esse intuito procedemos *in vitro* ás seguintes experiencias: Ganglios cazeozos de cobaias tuberculizadas com tuberculoze humana foram triturados e macerados em agua parfois les unes à la suite des autres, comme des streptocoques; elles sont parfois isolées, disséminées.

Dans les cultures récentes en pomme de terre, dans la tuberculose virulente, l'aspect de ces granulations est modifié; elles sont alors beaucoups plus petites. On peut faire les mêmes observations en les comparant dans les crachats d'individus non caverneux et dans ceux de tuberculeux anciens, cavitaires.

Cette différence est plus sensible dans les crachats des tuberculeux soumis pendant longtemps au traitement par la tuburculine. On arrive même, chez ces derniers, à ne plus trouver de bacilles qui puissent être révélés par le Ziehl, tandis que les granulations ne font que rarement défaut et que l'inoculation révèlé, chez les cobayes, l'existence de la tuberculose.

On observe les mêmes phénomènes dans le pus tuberculeux, ainsi que dans le cas des abcès froids, et c'est là que la forme granulaire décrite dernièrement par Muchs trouve son explication.

D'où l'on a déduit que la forme granulaire est, sinon la forme de résistance caractéristique, tout au moins la forme la plus résistante que puisse prendre le bacille de la tuberculose.

L'absence de bacilles de la tuberculose déterminables par le Ziehl dans le pus des abcès tuberculeux; l'existence dans ce pus tuberculeux des granulations et de bacilles que nous révèle la méthode de Gram, et l'électivité des granulations du bacille pour cette méthode de coloration, telles sont les raisons qui nous ont poussés à vérifier s'il se formait dans les ganglions tuberculeux une substance capable de modifier la structure du bacille de la tuberculose ou même de le détruire.

Dans ce but, nous avons procédé *in vitro* aux expériences suivantes: Des ganglions caséeux de cobayes tuberculisés avec de la tuberculose humaine ont été triturés et mis en macération dans de l'eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 %. Cette émulsion a éte divisée en deux parties qui sont restées dans l'étuve à 38° c., l'une pendant 48 heures et l'autre pendant 72.

Au bout de ce temps, les émulsions ont

fiziologica glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %. Essa emulsão foi dividida em duas porções que permaneceram na estufa a 38º c uma, durante 48 horas e outra durante 72 horas.

Findos esses prazos foram as emulsões filtradas em algodão e o filtrado uzado então em nossos ensaios.

Como testemunhas empregámos ganglios de cobaias infetadas com tripanozomas, que provocam forte reação ganglionar, e como consequencia, adenopatias volumozas. Essas cobaias eram consideradas normais em relação ás infetadas com tuberculoze. Esses ganglios eram igualmente triturados e emulcionados em agua fiziolojica glicerinada e fenicada e postos a macerar em condições identicas aos ganglios tuberculozos.

Por outro lado, nos utilizavamos de emulsão de bacilos de tuberculoze feita em veiculo identico ao empregado para os extratos ganglionares, para servir de testemunha ao extrato de ganglios normais.

Eram as emulsões ganglionares postas em contato com os bacilos tuberculozos, obedecendo á tecnica abaixo descrita.

As contajens foram feitas com oc. 12 Zeiss em laminas coradas pelo metodo que proponho neste trabalho, uzando no entretanto como descorante sómente o alcool absoluto.

As preparações das emulsões bacilares que continham extrato de ganglios tuberculozos eram feitas em uma extremidade da lamina; a outra extremidade era ocupada pela preparação da emulsão que continha o extrato de ganglio normal. Assim ficavam as preparações testemunhas em condições identicas de experimentação.

Para maior facilidade adotámos a seguinte notação no correr da experimentação:

e. g. t. = extrato de ganglios tuberculozos.
e. g. n. = extrato de ganglios normais.
e. b. t. = emulsão de bacilos da tuberculoze.
v. = veiculo (agua fiziolojica glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %.

été filtrées à travers de l'ouate et le résidu employé dans nos expériences.

Nous nous sommes servi, comme témoins de ganglions de cobayes infectés par des trypanosomes qui provoquent une forte réaction ganglionnaire et, en conséquence, de volumineuses adénopathies. Ces cobayes étaient considérés normaux par rapport aux cobayes infectés par la tuberculose. Ces ganglions étaient également triturés et émulsionnés dans de l'eau physiologique, glycérinée et phéniquée, et la macération etait faite dans des conditions identiques à celles des ganglions tuberculeux.

D'un autre côté, nous nous sommes servis d'une émulsion de bacilles de la tuberculose faite dans les mêmes véhicules employés pour les extraits ganglionnaires, pour servir de témoin à l'extrait des ganglions normaux.

Les émulsions ganglionnaires êtaient mises en contact avec les bacilles tuberculeux, d'après le procédé que nous avons décrit.

Les comptages ont été faits avec l'oc. 12 Zeiss sur des lames colorées par la méthode proposée ci-dessus, mais en n'employant comme décolorant que l'alcool absolu.

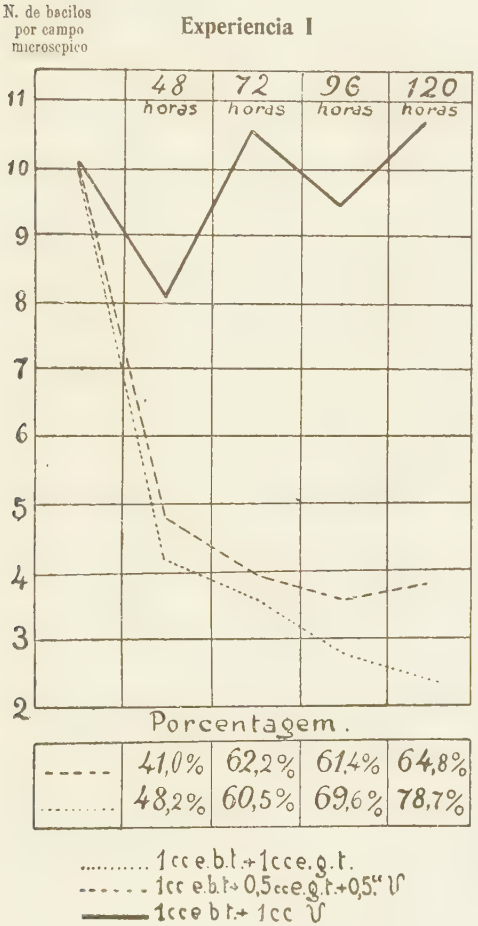
Les préparations des émulsions bacillaires qui contenaient de l'extrait des ganglions tuberculeux étaient faites sur l'extrémité d'une lame; à l'autre extrémité se trouvait la préparation de l'émulsion qui contenait l'extrait du ganglion normal. Les préparations témoins se sont ainsi trouvées dans des conditions identiques d'expérimentation.

Pour simplifier la chose, nous avons adopté la notation suivante au cours de l'expérimentation:

e. g. t. = extrait de ganglions tuberculeux.
e. g. n. = » » » normaux.
e. b. t. = émulsion de bacilles de la tuberculose.
v. = véhicule (eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 %.

Nous avons employé la technique suivante: Les extraits ganglionnaires étaient mélangés avec une émulsion de bacilles de tuberculose humaine faite dans de l'eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 % dans les proportions suivantes:

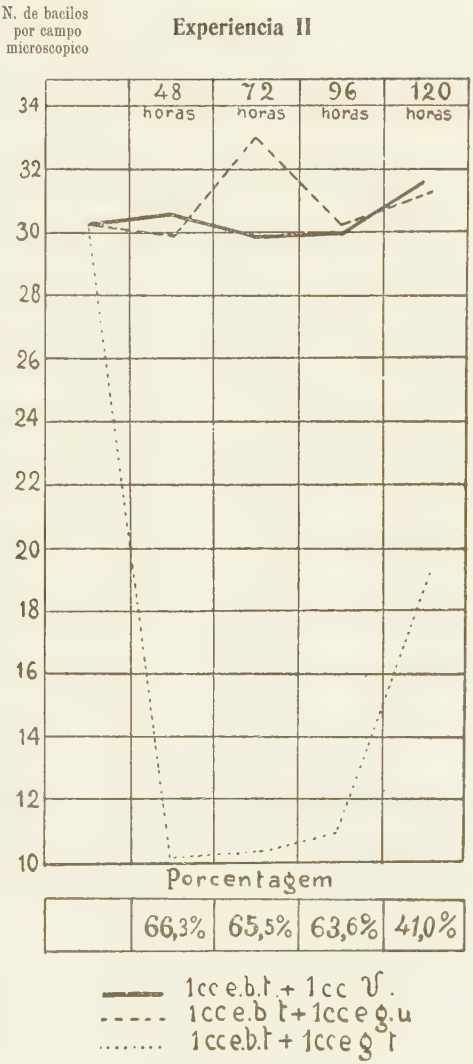
Uzámos da seguinte tecnica: Os extratos ganglionares eram misturados a uma emulsão de bacilos de tuberculoze humana feita em agua fiziolojica, glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %, na seguinte proporção:



Experiencia I

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 5 cc e. g. t. + 5 cc v.
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (testemunha).

Essas misturas, colocadas em tubos arrolhados com rolhas de borracha permaneciam na estufa a 38º c., sendo ajitadas diariamente e no momento de se fazerem as preparações para as contajens.



Expérience I

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 5 cc e. g. t. + 5 cc v.
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (témoin).

Ces mélanges étaient placés dans des tubes recouverts d'un bouchon en caoutchouc et restaient dans une étuve à 38º C. On les agitait tous les jours et au moment de faire les préparations pour les comptages.

Experiencia II

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. n. (testemunha).
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (testemunha).

Procedeu-se de modo identico ao da Experiencia I.

Pelo exame desses rezultados vemos que o produto da extração dos ganglios normais não exerce ação sobre os bacilos da tuberculoze; por outro lado, os ganglios tuberculozos cazeificados contêm uma substancia cuja ação se exerce até 120 horas de contato (Exp. I). O pequeno aumento observado no numero de bacilos entre 96 a 120 horas depois (Exp. II) pode ser explicado por dezagregação de algum grumo bacilar.

Tratámos, então, de verificar si essa substancia seria reativada:

A) Pela adição de maior quantidade de e. g. t.
B) Pela adição de sôro fresco de cobaia nova.

A) Ao tubo que continha 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. n. juntou-se 1 cc de e. g. n. (tubo a); ao tubo que continha 1 cc de e. b. t. + 1 cc de e. g. t. juntou-se 1 cc de e. g. t. tubo b).

Médias das contajens feitas 24 horas depois da permanencia na estufa a 38º c.

Tubo a) = 23,04.
Tubo b) = 13,85.

Relações entre as contajens feitas antes e depois da nova adição de emulsões ganglionares:

e. g. n. $\frac{31.1}{17.9} = 1{,}73$ e. g. t. $\frac{23.4}{13.8} = 1{,}69$

B) A 0,75 cc do tubo *a* juntou-se 0,05 cc de agua fiziolojica + 1 cc de sôro fresco de cobaia nova tubo a).
A 0,75 cc do tubo *b* juntou-se 0,05 cc de agua fiziologica + 1 cc de sôro fresco de cobaia nova (tubo b).

Médias obtidas 48 horas depois da ação do sôro á temperatura de 38º c.

Tubo a) = 10,9 bacilos por campo.
Tubo b) = 06,2 » » »

Expérience II

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. n. (témoin).
1 cc e. b. t. + 1 cc v. (témoin).

On a agi de façon identique à celle de l'Expérience I.

Voici les résultats obtenus:

Nous voyons par l'examen de ces résultats que le produit de l'extraction des ganglions normaux n'a pas d'influence sur les bacilles de la tuberculose; d'un autre côté, les ganglions tuberculeux caséifiés contenaient une substance dont l'action se fait sentir jusqu'à 120 heures de contact (Exp. I). La petite augmentation observée dans le nombre de bacilles de 96 à 120 (Exp. II) peut s'expliquer par la désagrégation d'un grumeau bacillaire.

Nous avons ensuite tâché de vérifier si cette substance pouvait être réactivée:

A) Par l'addition d'une plus grande quantité de e. g. t.
B) Par l'addition de sérum frais d'un cobaye jeune.

A) Au tube qui contenait 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. n. on a ajouté 1 cc de e. g. n. (tube a); au tube qui contenait 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. t. on a ajouté 1 cc de e. g. t. (tube b).

Moyennes des comptages effectués 24 heures après une permanence dans l'étuve à 38º c.

Tube a) = 23,04.
Tube b) = 13,85.

Rapports entre les comptages effectués avant et après la nouvelle addition d'émulsions ganglionnaires:

e. g. n. $\frac{31.1}{17.9} = 1{,}73$ e. g. t. $\frac{23.4}{13.8} = 1{,}69$

B) A 0,75 cc du tube *a* on a ajouté 0,05 cc d'eau physiologique + 1 cc de sérum frais de cobaye (tube a).
A 0,75 cc du tube *b* on a ajouté 0,05 cc d'eau physiologique + 1 cc de sérum frais de cobaye (tube b).

Moyennes obtenues 48 heures après l'action du sérum, à la température de 38º c.

Tube a) = 10,9 bacilles par champ.
Tube b) = 6,2 » » »

Relações obtidas pelas contajens feitas antes e depois da ação do sôro:

antes $\frac{23,4}{13,8} = 1,73$ relação entre *a* e *b*

depois $\frac{10,9}{06,2} = 1,79$ relação entre a) e b)

o que indica não ser essa substancia reativada por adição de maior quantidade della, nem pelo sôro de cobaia nova.

O aquecimento entre 65 e 70º c., durante 1 hora destróe essa substancia. E' o que rezulta da seguinte tabela:

	N. de bacilos por campo		
	24 h.	48 h.	72 h.
Tubo 1: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t.	6,12	2,03	03,02
» 2: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t. (aquecido entre 65 e 70º, durante 1 hora)	9,03	22,00	13,00
Tubo 3: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. n.	11,04	10,45	13,03

Restava indagar si essa substancia, que até então se comportava como fermento, exercia sua ação sobre as cêras incluidas no corpo do bacilo.

Utilizámo-nos, então, de ganglios tuberculozos cazeozos de boi de onde extraimos a substancia ativa do seguinte modo: determinado pezo de ganglios tuberculozos cazeozos triturados era emulsionado em 5 vezes o seu pezo de agua fiziolojica glicerinada a 10 % e fenicada a 0,5 %, sua emulsão permaneceu na estufa por trez dias, sendo depois reduzida em B. M. a 38º C. ao decimo de volume. Depois da emulsão passada em tamiz procede-se á separação dos elementos solidos em suspensão, por centrifugação. A parte liquida, separada por decantação encerra a substancia ativa e deve ser conservada ao abrigo do ar e da luz.

Tomando uma pequena porção desse extrato glicerinado e tratando-o pelo alcool absoluto forma-se um precipitado que, lavado sobre filtro de papel repetidas vezes pelo alcool para acarretar as substancias gordurozas nelle soluveis, se redissolve facilmente em agua fiziolojica.

Essa substancia em solução mostra ação francamente saponificante sobre a cêra ex-

Rapports obtenus par les comptages effectués avant et après l'action du sérum:

avant $\frac{23,4}{13,8} = 1,73$ rapport entre *a* et *b*

après $\frac{10,9}{6,2} = 1,79$ rapport entre a) et b)

ce qui prouve que cette substance n'est pas «reactivée» par l'addition d'une plus grande quantité d'elle-même, ni par le sérum de cobaye.

Le chauffage de 65 à 70º c, pendant 1 heure, détruit cette substance. C'est ce qu'on déduit du tableau suivant:

	N. de bacilles par champ		
	24 h.	48 h.	72 h.
Tube 1: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t.	6,12	2,03	3,02
» 2: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t. (chauffé pendant 1 heure, de 65 à 70º)	9,03	22,00	13,00
Tube 3: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. n.	11,04	10,45	13,03

Il nous restait à chercher si cette substance qui agissait, jusqu'alors, comme un ferment, exerçait son action sur les cires contenues dans le corps du bacille.

Nous nous sommes alors servi de ganglion tuberculeux caséeux de bœuf d'où nous extrayions la substance active comme suit: Une certaine quantité de ganglions tuberculeux caséeux triturés était émulsionnée en 5 fois son poids d'eau physiologique glycérinée à 10 % et phéniquée à 0,5 %. Cette émulsion est restée trois jours dans l'étuve; après, elle a été réduite au B. M., à 38º C, au dixième de son volume. Après avoir passé l'émulsion au tamis, on a séparé les éléments solides en suspension par centrifugation. La partie liquide, séparée par décantation referme la substance active et doit être conservée à l'abri de l'air et de la lumière.

En prenant une petite quantité de cet extrait glycériné et en le traitant par l'alcool absolu, il se forme un précipité qui, après avoir été lavé plusieurs fois avec de l'alcool, sur un filtre en papier, pour faire disparaître les substances graisseuses solubles qu'il renferme, se dissout de nouveau facilement dans de l'eau physiologique.

Cette substance dissoute dans l'eau physiologique montre une action franchement sa-

traida pelo xilol do bacilo da tuberculoze, quando permanece na estufa a 38º C. durante 24 ou 48 horas. Dêmos a essa substancia a denominação de tuberculo-ciraze.

Uzando tecnica adequada pudemos obter, em virtude dessa saponificação, cristais de palmitina, reunidos em feixes, assim como graxas córaveis pelo *Sudão* e, palidamente, pelo acido osmico.

Procedemos do seguinte modo: Um pouco de tuberculo-ciraze dissolvida em agua fiziolojica, apoz precipitação e lavajem repetida pelo alcool, era posta em contato com um fragmento de cêra de bacilos da tuberculoze, extraida pelo xilol e precipitada pelo alcool absoluto fervente que, mantendo-a dissolvida e em fuzão, devia acarretar as substancias gordurozas soluveis nelle, cazo ellas existissem aí aderentes aos fragmentos de cêra. Como testemunhas empregámos tubos contendo respetivamente cada um, agua fiziolojica e tuberculo-ciraze, agua fiziolojica e cêra.

Depois de permanecerem em contato na estufa a 38º, por 48 horas, foram esses tubos tratados pelo alcool absoluto em excesso e levados á ebulição. Apoz o resfriamento, filtravam-se os licores alcoolicos em filtros para precipitado.

O liquido alcoolico era então tratado por uma solução de soda muito diluida e levada á ebulição.

Deixava-se resfriar; tratava-se depois por uma solução muito diluida de acido sulfurico; fervia-se; deixava-se novamente resfriar. Tratava-se pelo eter.

Apoz a separação das duas camadas, decantava-se a camada eterea sobre um tubo contendo agua distilada. Deixava-se evaporar o eter; quando a evaporação era quazi total, tratava-se pelo *Sudão*.

Examinando em gota pendente encontrava-se, *sómente no tubo* que *continha cêra* e *tuberculo-ciraze* sobre a superficie do liquido globulos de gordura perfeitamente córados, de mistura com grande quantidade de cristais de materia corante. Depozitando uma gota de eter que sobrenadava á agua em uma lamina, antes de fazer ajir a materia corante,

ponifiante sur la cire extraite par le xylol du bacille de la tuberculose, quand il reste dans l'étuve à 38º C., pendant 24 ou 48 heures. Nous avons donné à cette substance le nom de *tuberculo-cirase*.

En employant un procédé convenable, nous avons pu obtenir, grâce à cette saponification, des cristaux de palmitine réunis en faisceaux, ainsi que des corps gras pouvant être colorés par le *Soudan* et, faiblement, par l'acide osmique.

Notre méthode a éte la suivante: Um peu de tuberculo-cirase dissoute dans de l'eau physiologique, après avoir été précipiteé et plusieurs fois laveé par l'alcool, était mise en contact avec um fragment de cire de bacilles de la tuberculose, extraite par le xylol et précipitée par l'alcool absolu. Avant d'être mise en contact avec la tuberculo-cirase, la cire était traitée par l'alcool absolu bouillant qui, la conservant dissoute et en fusion, devait entrainer les substances grasses solubles dans ce vehicule, dans le cas où il y en aurait d'adhérentes aux fragments de cire. Nous nous sommes servi, comme témoins, de tubes contennant, l'un, de l'eau physiologique, et de la tuberculocirase et l'autre, de l'eau physiologique et de la cire. Après être restés pendant 48 heures à l'etuve à 38º, ces tubes ont été traités par l'alcool absolu, en excès, et amenés au point d'ébullition. Après leur refroidissement, on filtrait les liqueurs alcooliques dans des filtres pour précipités.

Le liquide alcoolique était alors traité par une solution de soude très diluée et bouillante. On le laissait refroidir et il était ensuite traité par une solution très diluée d'acide sulfurique; on faisait bouillir et on laissait refroidir de nouveau, puis, on le traitait par de l'éther.

Après la séparation des deux couches, on décantait la couche éthérée sur un tube contenant de l'eau distillée. On laissait évaporer l'éther; quand l'évaporation était presque totale, on traitait par le *Soudan*.

En examinant en goutte suspendue on trouvait, *seulement dans le tube contenant de la cire et de la tuberculo-cirase*, à la surface du liquide, des globules de graisse nettement colorés mélangés avec une grande quantité de

pela evaporação do veiculo, observava-se uma substancia amorfa soluvel no alcool cuja evaporação ocazionava o aparecimento de cristais.

Tomando o licôr alcoolico acima referido, antes de o tratarmos pela soda, e depositando uma gota sobre a lamina, pela evaporação do veiculo, observam-se abundantes cristais morfolojicamente semelhantes á mistura de palmitina e estearina e palhetas aguçadas nas pontas. Para ponto de fuzão desses cristais encontramos 75º C.

A separação dos alcooles constituintes da cêra, obtidos pelo tratamento do licor com o eter, apoz a saponificação pela soda, não nos revelou a existencia de colesterina, izocolesterina e fitosterina, quando sujeitados ás reações respetivas.

Pensamos pois que se tratam de alcooles izomeros com esses.

Concluzões

1.º A acido rezistencia do bacilo da tuberculoze não é devida excluzivamente ás cêras e gorduras existentes no corpo do bacilo.

2.º O bacilo da tuberculoze pode ser diferençado nitidamente dos pseudo-tuberculozos por metodos de coloração especiais que revelam as granulações do interior do bacilo.

3.º Essas granulações têm eletividade para o Gram, em relação ao resto do bacilo.

4.º Essas granulações reprezentam a fórma de maior rezistencia do bacilo.

5.º Nos ganglios tuberculozos cazeificados existe uma substancia capaz de diminuir, *in vitro*, o numero de bacilos da tuberculoze, em dada emulsão.

6.º Essa substancia não é reativada pelo sôro fresco de cobaia nova.

7.º A ação maxima dessa substancia se exerce até 120 horas de contato.

8.º Essa substancia é destruida pelo aquecimento entre 65º e 70º, durante 1 hora.

cristaux de la matière colorante. En déposant sur une lame une goutte de l'éther qui surnageait, avant de faire agir la matière colorante, par l'évaporation du véhicule, on observait une substance amorphe soluble dans l'alcool, et dont l'évaporation donnait lieu à la formation de cristaux.

En prenant la liqueur alcoolique citée cidessus, avant de la traiter par la soude et en déposant une goutte sur la lame, l'évaporation du véhicule nous permet d'observer une grande abondance de cristaux, d'une forme semblable à un mélange de palmitine et stéarine, et de paillettes à deux pointes aigues. Le point de fusion de ces cristaux est de 75º C.

La separation des alcools constitutifs de la cire, obtenus par le traitement de la liqueur avec l'ether, après la saponification par la soude, ne nous a révélé l'existence, ni de cholestérine, ni d'isocholestérine, ni de phytostérine, après avoir été soumis aux réactions nécessaires.

Nous pensons donc qu'il s'agit d'un autre isomère de la cholestérine.

Conclusions

1. La résistance du bacille de la tuberculose aux acides n'est pas due exclusivement aux cires et aux graisses contenues dans le corps du bacille.

2. Le bacille de la tuberculose peut être nettement différencié des pseudo-tuberculeux par des méthodes de coloration spéciale qui révèlent les granulations de l'interieur du bacille.

3. Ces granulations ont de l'électivité pour le Gram par rapport au reste du bacille.

4. Ces granulations représentent la forme de plus grande résistance du bacille.

5. Dans les ganglions tuberculeux caséifiés il existe une substance capable de réduire *in vitro* le nombre des bacilles de la tuberculose, en une émulsion déterminée.

9. Cette substance n'est pas reactivée par l'action du sérum frais de cobaye.

7. L'action *maxima* de cette substance se fait sentir jusqu'à 120 heures de contact.

9.º Essa substancia atúa sobre a cêra do bacilo da tuberculoze, saponificando-a.

10 A saponificação da cêra por essa substancia mostra a existencia de palmitina e estearina, caraterizadas pela morfolojia e ponto de fuzão dos cristais.

11 Essa substancia entra na classe dos enzimas idrolizantes.

8. Cette substance est détruite par le chauffage entre 65 e 70º, pendant 1 heure.

9. Cette substance saponifie la cire du bacille de la tuberculose.

10. La saponification de la cire par cette substance a montré l'éxistence de palmitine et stéarine, caractérisées par la morphologie et le point de fusion des cristaux.

11. Cette substance entre dans la classe des enzymes hydrolysants.

Contribuição para o estudo dos dipteros.

Observações sobre a biolojia e sistematica das anofelinas brazileiras e suas relações com o impaludismo

pelo

Dr. Arthur Neiva,

Assistente do Instituto.

(Estampa 4)

Beitrag zur Kenntniss der Dipteren.

Beobachtungen über die Biologie und Systematik der brasilianischen Anophelinen und deren Beziehungen mit der Malaria

von

Dr. Arthur Neiva,

Assistenten.

(Tafel 4)

Dos 20 generos que constituem a sub-familia *Anophelinæ,* 8 tem reprezentantes no Brazil, sendo que, destes 4 são excluzivamente brazileiros.

Até ha pouco tempo o genero *Pyrethophorus* possuia duas especies brazileiras, deixou, porém, de ser reprezentado na dipterolojia brazilica, com a creação dos generos *Chagasia* e *Myzorhynchella.*

Os generos existentes no Brazil são reprezentados pelas seguintes especies: *Myzomyia lutzi* Theo., *Myzomyia tibiamaculata* Neiva, *Myzomyia gilesi* Neiva, *Cyclolepteron mediopunctatum* Theo.-Lutz, *Cyclolepteron intermedium* Chagas, *Stethomyia nimba* Theo., *Myzorhynchella lutzi* Cruz, *Myzorhynchella parva* Chagas, *Myzorhynchella nigritarsis* Chagas, *Arribalzagaia maculipes* Theo., *Arribalzagaia pseudo-maculipes* Chagas, *Cellia argyrotarsis* Rob. Desv., *Cellia albimana* Wied., *Cellia brasiliensis* Chagas, *Chagasia fajardoi* Lutz, *Manguinhosia lutzi* Cruz.

A especie comum é a *Cellia albimana* que tem sido encontrada em todo o Brazil. O mesmo acontece com a *Cellia argyrotarsis.*

Von den 20 Gattungen, welche die Unterfamilie der Anophelinen bilden, sind 8 in Brasilien vertreten und 4 ausschliesslich brasilianisch.

Bis vor kurzer Zeit besass die Gattung *Pyrethophorus* zwei brasilianische Arten, welche seit der Schöpfung der Gattungen *Chagasia* und *Myzorhynchella* in der brasilianischen Dipterologie nicht mehr erwähnt wurden.

Die in Brasilien vorkommenden Gattungen sind durch folgende vertreten:

Myzomyia lutzi Theob., *Myzomyia tibiamaculata* Neiva, *Myzomyia gilesi* Neiva, *Cyclolepteron mediopunctatum* Theob.-Lutz, *Cyclolepteron intermedium* Chagas, *Stethomyia nimba* Theob., *Myzorhynchella lutzi* Cruz, *Myzorhyuchella parva* Chagas, *Myzorhynchella nigritarsis* Chagas, *Arribalzagaia maculipes* Theob., *Arribalzagaia pseudomaculipes* Chagas, *Cellia argyrotarsis* Rob. Dasv., *Cellia albimana* Wied, *Cellia brasiliensis* Chagas, *Chagasia fajardoi* Lutz, *Manguinhosia lutzi* Cruz.

Die gewöhnlichste Art ist: *Cellia albimana,* welche in ganz Brasilien gefunden wird; dasselbe gilt von *Cellia argrotarsis.*

A *Stethomyia nimba* só tem sido encontrada nos Estados do Pará e no de Minas; neste Estado são encontradas todas as especies de anofelinas brazileiras, com exceção da *Arribalzagaia pseudo-maculipes* e do *Cyclolepteron intermedium.*

As especies *Manguinhosia lutzi, Cellia brasiliensis, Myzorhynchella nigritarsis, Myzomyia tibiamaculata, Myzomyia gilesi,* por emquanto, sómente na rejião mineira têm sido encontradas.

Na cidade do Rio de Janeiro e no Estado do Rio, são encontradas as mesmas especies que ocorrem no Estado de S. Paulo, excetuando a *Chagasia fajardoi,* que, além de Minas, existe em S. Paulo.

Além destas rejiões, as mais conhecidas, pouco se poderá adiantar de seguro, quanto á maioria dos Estados, ainda quazi ignorados ou conhecidos deficientemente, como os do Pará, Bahia, Amazonas e Pernambuco.

Na cidade do Rio de Janeiro, além das duas *Celliæ* mais vulgarmente conhecidas, ainda existem os *Myzorhynchella lutzi, parva, Myzomyia lutzi, Arribalzagaia maculipes, pseudomaculipes* os *Cyclolepteron mediopunctatum, intermedium.*

O *Cyclolepteron mediopunctatum* é em toda a parte geralmente escasso; já não acontece o mesmo com o *Cyclolepteron intermedium,* que, em certas localidades é muito abundante.

Cada localidade possue sua especie predominante e que é geralmente uma das duas *Cellia albimana* ou *argyrotarsis,* mais comummente a primeira; comtudo logares ha, onde não predominam.

Em Piáu (Juiz de Fóra) Minas, as *Myzorhynchella lutzi* e *parva* são as especies predominantes; em Xérem (Estado do Rio) a *Arribalzagaia pseudo-maculipes* aparece em maior quantidade que a *Cellia albimana,* aliaz muito abundante.

Em Lassance (Minas), a especie predominante é a *Cellia brasiliensis,* entretanto estremamente rara em Juiz de Fóra, rejião bem estudada.

Stethomyia nimba wurde bisher nur in den Staaten Pará und Minas gefunden, in letzterem wurden alle Arten der brasilianischen Anophelinen mit Ausnahme der *Arribalzagaia pseudomaculipes* und des *Cyclolepteron intermedium,* beobachtet.

Die Arten: *Manguinhosia lutzi, Cellia brasiliensis, Myzorhynchella nigritarsis, Myzomyia tibiamaculata* und *Myzomyia gilesi* wurden bis heute nur in der Gegend von Minas gefunden.

In der Stadt Rio de Janeiro und dem Staate desselben Namens findet man dieselben Arten, welche in dem Staate S. Paulo vorkommen, mit Ausnahme der *Chagasia fajardoi,* welche ausser in Minas auch in S. Paulo gesammelt wurde. Diese Gegenden sind am besten bekannt; in Bezug auf die anderen Staaten, wie Pará, Bahia, Amazonas und Pernambuco, die mangelhaft bekannt sind, wird man wenig sicheres sagen können.

In der Stadt Rio de Janeiro gibt es, ausser den zwei *Cellias,* welche am meisten bekannt sind, noch *Myzorhynchella lutzi, parva, Myzomyia lutzi, Arribalzagaia maculipes, pseudomaculipes, Cyclolepteron mediopunctatum* und *intermedium.*

Cyclolepteron mediopunctatum ist überall spärlich, was bei *Cyclolepteron intermedium* nicht der Fall ist; vielmehr ist dieses an bestimmten Orten sehr reichlich vorhanden.

Die meisten Orte besitzen eine vorherrschende Art, welche gewöhnlich eine der zwei *Celliæ* (*albimana* oder *argyrotarsis*) ist, meistens ist es die erstere; es gibt aber auch Orte, wo keine Art vorherrscht.

In Piau (Juiz de Fóra), Minas sind *Myzorhynchella lutzi* und *parva* die vorherrschenden Arten; im Xerém (Staate Rio) ist die *Arribalzagaia pseudomaculipes* zahlreicher, als die *Cellia albimana,* obgleich letztere sehr häufig vorkommt.

In Lassance (Minas) ist *Cellia brasiliensis* die vorherrschende Art; dagegen ist sie in Juiz de Fóra, einer recht gut erforschten Gegend, ausserordentlich selten.

Die *Chagasia fajardoi,* häufig in Minas (Juiz de Fóra, Barbacena, Oliveira), ist dagegen im Staate S. Paulo sehr spärlich.

A *Chagasia fajardoi,* abundante em Minas (Juiz de Fóra, Barbacena, Oliveira) é escassa nas localidades do Estado de S. Paulo, onde tem sido encontrada.

A *Manguinhosia lutzi,* até agora, só foi encontrada em Bicudos (Minas).

A biolojia das anofelinas brazileiras ainda se encontra muito atrazada; para isto, muito concorre a dificuldade que eziste para se encontrarem as larvas de certas especies.

Apenas de 8 especies de anofelinas são conhecidas as larvas: *Cellia argyrotarsis, Cellia albimana,* larvas muito comuns e prezentes em qualquer depozito d'agua; *Myzohrynchella lutzi* e *parva,* larvas comuns nos pequenos brejos; *Myzomyia lutzi* larva quazi excluzivamente bromelicola.

As larvas de *Chagasia fajardoi* e de *Arribalzagaia pseudo-maculipes* foram creadas artificialmente de posturas obtidas no laboratorio.

Fato extremamente curiozo, é o que se dá em certos logares, onde máo grado a espantoza abundancia de imajens, as pesquizas para a colheita de larvas de determinadas especies são totalmente infrutiferas, apezar de feitas simultaneamente por varias pessoas experimentadas nestes trabalhos, durante horas continuas e em dias sucessivos.

Em Xérem, onde amiudadas vezes pesquizámos larvas, nunca conseguímos capturar uma larva siquer das especies *Cyclolepteron mediopunctatum* e *intermedium* e rarissimas vezes colhémos uma ou outra larva de *Arribalzagaia pseudo-maculipes.*

Ao crepusculo, as anofelinas vêm sucessivamente por especies; esta observação feita pelo Dr. Carlos Chagas, tivemos ocazião de verificar, posteriormente, em diversas localidades.

Em Juiz de Fóra (Piáu), as especies aparecem na seguinte ordem: *Myzorhyncheila parva, Myzorhynchella lutzi* e por fim, quazi dentro da noite a *Chagasia fajardoi.*

Em Xérem, em primeiro logar surje a *Arribalzagaia pseudo-maculipes,* mais tarde o *Cyclolepteron intermedium* e, em seguida, o *Cy-*

Die *Manguinhosia lutzi* wurde bis heute nur in Bicudos (Minas) gefunden.

Die Biologie der brasilianischen Anophelinen ist noch wenig erforscht, da es schwierig ist, die Larven von bestimmten Arten zu finden.

Nur von 8 Arten der Anophelinen sind die Larven bekannt, nämlich von *Cellia argyrotarsis, Cellia albimana* (deren Larven sehr gewöhnlich und in jeder beliebigen Wasseransammlung vorhanden sind), *Myzorhynchella lutzi* und *parva.* Letztere sind gewöhnliche Larven in kleinen Sümpfen; *Myzomyia lutzi* findet man beinahe ausschliesslich in Bromeliaceen.

Die Larven der *Chagasia fajardoi* und der *Arribalzagaia pseudomaculipes* wurden aus den, im Laboratorium abgelegten Eiern, künstlich gezüchtet.

Ein äusserst interessanter Fall, welcher an einigen Orten beobachtet wurde, ist der, dass, trotz erstaunlicher Mengen von Mosquitos, die Bemühungen, die Larven von bestimmten Arten zu finden, ganz und gar fruchtlos geblieben sind, obgleich sie gleichzeitig von verschiedenen, in solchen Arbeiten gut bewanderten Forschern Stunden und Tage hindurch gesucht wurden.

In Xerém, wo wir oftmals Larven gesucht haben, ist es uns nie gelungen, eine einzige Larve von den Arten *Cyclolepteron mediopunctatum* und *intermedium* zu finden, und nur sehr selten kamen uns Larven von *Arribalzagaia pseudomaculipes* zu Gesicht.

In der Dämmerung folgen sich die Anophelinen artenweise; diese Beobachtung wurde von Dr. Carlos Chagas gemacht; später hatten wir Gelegenheit, dieselbe an verschiedenen Orten zu bestätigen.

In Juiz de Fóra (Piau) erschienen die Arten in nachstehender Reihenfolge:

Myzorhynchella parva, Myzorhynchella lutzi und zuletzt, beinahe schon am Abend, die *Chagasia fajardoi.*

In Xerém zeigt sich zuerst *Arribalzagaia pseudomaculipes,* später *Cyclolepteron intermedium,* und zuletzt, wenn der Abend schon im Anzuge ist, *Cyclolepteron mediopunctatum.*

Cellia albimana und *C. argyrotarsis* erschei-

clolepteron mediopunctatum, quando a noite já vem caindo.

As *Cellia albimana* e *argyrotarsis* aparecem simultaneamente, logo no principio do crepusculo, permanecendo até o fim.

Vizivelmente ha um otimo de luz que varia para cada especie, de maneira que, conforme o mez, a hora favoravel para o aparecimento e dezaparecimento das anofelinas não é constante.

Nesta rejião observámos que, em Junho, a chegada das anofelinas dava-se ás 5.30 p. m. e a partida ás 6 horas p. m.; dia a dia chegavam mais tarde e, em meiados de Agosto, a hora habitual ocilava entre 5.50 p. m. e 6 horas (chegada) e 6.10 p. m. e 6.20 (partida); raramente se observava entre a chegada da primeira anofelina e o dezaparecimento total, um espaço de tempo que fosse além de 30 e aquém de 15 minutos.

Uma ocazião, porém, 11 de Outubro, as anofelinas começaram a aparecer ás 6.10 p. m. e só se retiraram ás 7.15 p. m., tendo, por conseguinte permanecido durante 65 minutos.

Foi a maior demora que observámos e que tem explicação, no fato da grande claridade não só da noite, como tambem de uma fogueira, cujos reflexos chegavam a iluminar os cavalos sobre os quais colhiamos as anofelinas.

Já tinhamos verificado que nas noites de luar, a permanencia das anofelinas prolongava-se um pouco mais que o habitual.

Em prezença de luz, as anofelinas picam a qualquer hora da noite; muitas vezes, dentro do laboratorio e em horas diferentes da noite, capturámos anofelinas quando sugavam.

Não acreditamos que as anofelinas suguem em completa escuridão, não excetuando a *Chagasia fajardoi* que, de todas é a que fica em prezença de menor quantidade de luz.

Pela madrugada, as anofelinas só aparecem, quando já ha certa claridade e, á medida que esta aumenta, crece o numero daquellas até que, passando um espaço de tempo um pouco maior que o do crepusculo vespertino, retiram-se; durante o crepusculo

nen zugleich beim Beginn der Dämmerung und bleiben bis zuletzt.

Augenscheinlich muss es eine gewisse und bestimmte Lichtmenge geben, welche für jede Art schwankt, weshalb die günstige Stunde zum Erscheinen und Verschwinden der Anophelinen je nach dem Monat keine beständige ist.

In Xerém beobachtete ich, dass im Monat Juni die Anophelinen um 5.30 p.m. erschienen und um 6 Uhr p.m. verschwanden; Tag für Tag erschienen sie später, sodass sie Mitte August gewöhnlich zwischen 5.50 p.m. und 6 Uhr auftraten, um wieder zwischen 6.10 p.m. und 6,20 p.m. zu verschwinden; selten ergab sich zwischen der Ankunft der ersten Anophelinen und dem gänzlichen Verschwinden derselben ein Zeitraum von über 30 Minuten oder unter 15 Minuten.

Ausnahmsweise jedoch erschienen die Anophelinen am 11. October um 6.10 p.m. und verschwanden erst um 7.15 p.m.; sie wurden also während 65 Minuten beständig beobachtet.

Dies war der grösste Zeitraum, den wir feststellen konnten; derselbe war auch leicht zu erklären, da sich mit einer sehr hellen Nacht noch das Licht eines Freudenfestes combinirte, dessen Schein die Pferde, auf denen wir die Anophelinen fingen, beleuchtete.

Wir hatten schon festgestellt, dass in Mondscheinnächten der Aufenthalt der Anophelinen etwas länger dauerte, als gewöhnlich.

Bei Licht stechen die Anophelinen zu irgend einer Stunde der Nacht; sehr oft wurden im Laboratorium Anophelinen des Nachts beim Saugen beobachtet und das zu den verschiedensten Stunden.

Ich bezweifle, dass die Anophelinen in vollständiger Dunkelheit stechen, dies gilt auch für die *Chagasia fajardoi*, welche von allen Anophelinen diejenige ist, die am wenigsten Licht zum Stechen beansprucht.

In der Morgendämmerung erscheinen die Anophelinen, wenn schon eine gewisse Helligkeit vorhanden ist und während diese zunimmt, wächst ihre Anzahl; nachdem ein etwas grösserer Zeitraum, als bei der Abenddämmerung verflossen ist, verschwinden sie wieder; des Morgens erscheinen die Ano-

matutino, as anofelinas aparecem em muito menor numero que no crepusculo vespertino.

Em pleno dia, qualquer especie de anofelina pode ser capturada dentro da mata, todavia, em menor abundancia que aos crepusculos.

Em Piáu (Minas), capturámos diversos exemplares de *Chagasia fajardoi* ás 11 a. m. dentro de uma mata pouco sombria; o Dr. C. Chagas verificou que, em pleno sol, dentro de matas de vejetação rala a *Cellia brasiliensis* ataca fortemente.

Exemplares de *Cellia argyrotarsis* e *albimana*, de *Myzorhynchella lutzi, parva*, de *Arribalzagaia maculipes, pseudo-maculipes*, de *Cyclolepteron intermedium* e *mediopunctatum* já os temos capturado em diferentes horas do dia e em sitios de vejetação pouco densa.

Quanto á influencia dos fatores metereolojicos, pouco podemos informar.

A temperatura de 19º C. não exerce a menor influencia sobre o aparecimento das anofelinas; ainda a 17º C. as anofelinas aparecem com a mesma frequencia habitual e sugam com igual voracidade.

A chuva só tem influencia emquanto cae; uma hora depois de ter cessado de chover, inda que sejam copiozas cargas d'agua de algumas horas de duração, em varias experiencias que realizámos, tivemos a oportunidade de verificar quão abundantes são as anofelinas que facilmente podem ser capturadas, em grande numero.

Quando se vai operar uma mudança de tempo que acarrete chuva, as anofelinas são mais frequentes e vorazes.

Em dias extremamente cálidos, de 39º e mais á sombra, as anofelinas não se resentem do grande calor e picam com voracidade dezuzada.

Estes fatos foram observados quotidianamente durante o espaço de mais de ano e, referem-se ás 8 especies de anofelinas existentes no Xérem.

Para a captura das anofelinas utilizamonos de cavalos, de preferencia aos burros, por serem estes menos perseguidos pelos culíci-

phelinen in viel kleinerer Anzahl, als in der Abenddämmerung.

Im Walde kann jede Art von Anophelinen am hellen Tage gefangen werden, jedoch in kleinerer Menge, als in der Abenddämmerung.

In Piau (Minas) haben wir in einem wenig schattigen Walde verschiedene Exemplare von *Chagasia fajardoi* gefangen (11 Uhr a.m.). Dr. Chagas beobachtete, dass die *Cellia brasiliensis* in wenig lichten Wäldern selbst bei Sonnenschein lebhaft angreift.

Einzelne Exemplare von *Cellia argyrotarsis* und *albimana, Myzorhynchella lutzi, parva, Arribalzagaia maculipes, pseudomaculipes, Cycloleppteron intermedium*, und *mediopunctatum* wurden von mir schon zu verschiedenen Tageszeiten und an Plätzen mit wenig dichter Vegetation gefangen.

Ueber den Einfluss der Witterung können wir wenig berichten.

Die Temperatur von 19º C. hat nicht den geringsten nachtheiligen Einfluss auf die Zahl der Anophelinen, selbst bei 17º C. erscheinen die Anophelinen in der gewöhnlichen Menge und stechen mit derselben Gier.

Der Regen beeinflusst die Anophelinen nur während des Fallens; eine Stunde nachdem es aufgehört hat zu regnen, (selbst wenn während mehrerer Stunden reichlich Regen gefallen ist) hatte ich mehrmals Gelegenheit zu beobachten, wie häufig die Anophelinen erscheinen und wie leicht sie in Menge gefangen werden können.

Wenn das Wetter sich ändert und Regen droht, sind die Anophelinen häufig und blutdürstig; auch an sehr heissen Tagen, wenn das Thermometer im Schatten 39º C. und mehr aufweisst, stechen sie mit aussergewöhnlicher Gier.

Diese Beobachtungen, die während 14 Monaten täglich gemacht wurden, beziehen sich auf die 8 Arten von Anophelinen, die in Xerém vorkommen.

Um Anophelinen zu fangen, benutzen wir lieber Pferde, als Maultiere, da wir bemerkt haben, dass diese Mücken die Pferde vorzogen; letztere wurden dann in die Nähe der Sümpfe oder Wälder geführt.

das. Os cavalos são conduzidos para as proximidades dos pantanos ou para as matas.

Esta pratica, tem a grande conveniencia de facilitar a captura dos exemplares de culícidas, permitindo que se possam escolher as especies dezejadas.

As anofelinas, em geral, preferem picar o ventre dos animais; as *Myzorhynchella lutzi* e *parva* sugam tambem o pescoço, cabeça e ancas; o *Cyclolepteron mediopunctatum* prefere pouzar sobre as pernas, emquanto que o *Cyclolepteron intermedium* pouza de preferencia no ventre.

Com a utilização de cavalos e com o auxilio de um tubo de Ficalbi e em hora oportuna, capturam-se os culícidas que apareçam.

As anofelinas penetram nos domicilios geralmente, durante o crepusculo vespertino; a invazão matutina opera-se em menor numero.

Procuram picar logo que invadem, mas, devido ao fato, por emquanto inexplicavel, das anofelinas, mesmo as que não tenham sugado, retirarem-se, findo algum tempo, cessam de perseguir e pouzam pelas paredes, de onde levantam vôo á noite para novamente tentarem sugar se, porventura, o compartimento estiver iluminado.

Pela madrugada, as anofelinas que entraram á tarde, sugam avidamente os individuos que ainda se acham adormecidos; depois de repletos, pouzam novamente pelas paredes, onde esperam algumas horas (3 a 4 horas), até que passe o entorpecimento produzido pela repleção, para então abandonarem de vez o domicilio, retirando-se para a mata, de onde voltam á tarde para repetir a refeição.

Das anofelinas creadas em cativeiro, *C. albimana argyrotarsis, A. maculipes, pseudomaculipes, C. mediopunctatum, intermedium, C. fajardoi, M. lutzi, parva,* a maioria alimenta-se diariamente, e algumas fazem mais de uma refeição.

Podem-se tirar destes fatos, concluzões que sirvam para orientação, nas campanhas profilaticas, do serviço de destruição dos mosquitos adultos; que, conforme a nossa observação, deverá ser feito á noite ou logo ao

Dieses Verfahren gestattet nicht nur mit Leichtigkeit zahlreiche Individuen zu fangen, sondern auch eine Auswahl zu treffen.

Die Anophelinen stechen die Tiere mit Vorliebe am Rumpfe; *Myzorhynchella lutzi* und *parva* saugen auch am Halse, am Kopfe und an den Hüften; *Cyclolepteron mediopunctatum* zieht es vor, sich auf die Beine niederzulassen, während *Cyclolepteron intermedium* sich mit Vorliebe auf den Leib setzt.

Unter Benutzung von Pferden und mit Hilfe eines Ficalbischen Fangglases lassen sich zu passender Stunde alle Arten fangen, die am Orte vorkommen.

Die Wohnungen suchen die Anophelinen während der Abenddämmerung auf; während der Morgendämmerung dringen sie in geringeren Mengen ein. Sie suchen sofort nach dem Eindringen zu stechen und verfolgen die einzelnen Individuen während einer gewissen Zeit, welche länger ist, als die, welche wir bei den Pferden in Sümpfen beobachten konnten; diese Thatsache erklärt sich durch das Licht, das in den Wohnungen vorhanden ist. Nach einer gewissen Zeit stellen sie ihre Verfolgung ein und setzen sich an die Wände, ohne gestochen zu haben; nur selten gelingt es, Anophelinen zu fangen, welche sofort gesogen haben. Wenn das Zimmer beleuchtet ist, verlassen sie während der Nacht die Wände und versuchen zu stechen.

Bei Tagesanbruch saugen die Anophelinen, welche am Nachmittag eindringen, mit grosser Gier an Personen, die im Schlafe liegen. Einmal mit Blut gefüllt, setzen sie sich wieder an die Wände und warten einige (3—4) Stunden, während welcher die, nach dem Saugen eingetretene, Torpidität allmählig aufhört. Hierauf fliegen sie aus den Wohnungen ins Freie und kehren des Abends zurück, um die Blutaufnahme zu wiederholen.

In der Gefangenschaft ernähren sich die Anophelinen zum grössten Theil täglich, einige machen selbst mehr als eine Mahlzeit. Diese Beobachtung bezieht sich auf alle in Xerém vorkommenden Arten, mit Ausnahme der daselbst seltenen *Myzomyia lutzi,* und geben die nöthigen Anhaltspunkte, um bei den prophylactischen Massregeln die Vernich-

amanhecer, incontestavelmente as horas mais favoraveis para um espurgo proveitozo.

Quanto á sistematização, as anofelinas brazileiras sofrem da confuzão atualmente reinante neste departamento da dipterolojia.

Nossos estudos, sempre foram orientados pelas normas prescritas por Theobald e, por emquanto, ainda nos utilizamos de sua classificação embora, cada vez mais, reconheçamos quanto é falha.

Entre as ponderações que podemos fazer ao vol. IV da «A Monograph of the Culicidae», ha algumas restrições sobre o genero *Myzorhynchella* que Theo. creou com uma especie brazileira a *Myzorhynchella nigra.*

Por ainda estarmos subordinado a seu criterio sistematico aceitamos o genero, porém contestamos a especie, que não passa do antigo *Anopheles lutzi* — Cruz, 1901.

O carater em que se apoiou Theobald para formar este novo genero, isto é, a auzencia de escamas eretas bifurcadas, na cabeça, é um fato generalizado para todas as anofelinas brazileiras conhecidas, com exceção da *St. nimba* e *Chagasia fajardoi.*

Theobald refere-se ao abdomen da *Myzorhynchella lutzi,* como desprovido de escamas; com certeza o exemplar que lhe ditou esta afirmação, estava avariado, porquanto o segmento genital das *Myzorhynchella lutzi, parva, nigritarsis,* são abundantemente escamozos.

Para aceitarmos o genero tivemos que lhe acrecentar a principal carateristica: *abdomen pilozo, com exceção do segmento genital que é revestido de escamas.*

Aproveitando a oportunidade, vamos identificar a *Myzorhynchella lutzi* Cruz, cuja sinonimia tem sido das mais disparatadas.

Myzorhynchella lutzi — Cruz, 1901.

Anopheles lutzii — Cruz, 1901.

Nyssorhynchus albimanus (sinonimia) Blanchard, 1905.

Myzorhynchella nigra — Theo., 1907.

Das especies brazileiras de anofelinas, são transmissores provados de impaludismo as seguintes: *Cellia albimana* (Indias Ocidentais) *Cellia argyrotarsis* (Brazil) citadas por Stephens e Christophers, 3.ª edição.

tung der erwachsenen Mücken durchzuführen; es folgt daraus, dass dieselbe des Abends oder des Morgens in der Frühe vorgenommen werden sollte, da diese unzweifelhaft den günstigsten Zeitraum darstellen.

Die Classification der brasilianischen Anophelinen leidet zweifellos der Dipterologie in diesem Gebiete unter der gegenwärtig noch herrschenden Verwirrung. Bei derselben folgte ich immer den von Theobald aufgestellten Regeln, dessen Classification ich auch beibehalte, obgleich ich deren Unzulänglichkeit täglich mehr einsehe. Der Haupteinwand, den ich gegen dieselbe, wie sie im vierten Bande seiner Monographie enthalten ist, zu machen habe, bezieht sich auf das Genus Myzorhynchella, welches Theobald auf eine brasilianische, seine *Myzorhynchella nigra,* gründete. Obgleich ich, seiner Classification folgend, das Genus acceptire, muss ich doch die Artbezeichnung beanstanden, da es sich lediglich um die bereits 1901 von Cruz als *Anopheles lutzi* beschriebene Art handelt. Das Kennzeichen, auf welches Theobald die Gründung des neuen Genus basirt, nämlich die Abwesenheit von aufgerichteten und gabelförmigen Schuppen, ist allen brasilianischen Anophelinen gemeinsam, mit alleiniger Ausnahme der *Stethomyia nimba* und der *Chagasia fajardoi.* Theobald bezeichnet das Abdomen seiner Myzorhynchella als frei von Schuppen, jedoch ist wenigstens bei gut erhaltenen Exemplaren bei den *Myzorhynchellaarten lutzi, parva* und *nigritarsis* das Genitalsegment reichlich mit Schuppen bedeckt. Um das Genus anzuerkennen, muss ich als Hauptcharacter anführen: «Abdomen behaart, mit Ausnahme des Genitalsegments, welches mit Schuppen bedeckt ist».

Bei dieser Gelegenheit möchte ich noch die Synomyie der M. *lutzi* citiren; dieselbe ist eine äusserst confuse, nämlich:

(*M. lutzi Cruz*) *Anopheles Lutzii Cruz* 1901, *Pyrethophorus Lutzi Bourroul* 1904, *Nyssorhynchus albimanus* ex parte Blanchard (irrtümlich als Synonym angeführt) 1905, *Myzorhynchella nigra.*

Ich gehe nun auf die Rolle über, welche die einzelnen Anophelinenarten bei der Uebertragung der Malaria spielen:

As pesquizas feitas entre nós deram o seguinte rezultado: transmitem terçã maligna as *Cellia argyrotarsis* (Gomes de Faria, Ruy Ladislao) *Cellia albimana* (Ruy Ladislao) *Arribalzagaia pseudo-maculipes* (Ruy Ladislao, Neiva) *Cyclolepteron intermedium* (Ruy Ladislao, Neiva); terçã benigna as *Cellia albimana* (Chagas, Ruy Ladislao) *Cellia argyrotarsis* (Ruy Ladislao).

Estas verificações foram feitas do seguinte modo:

As anofelinas eram alimentadas em impaludados gametoforos que, em varios e minudentes exames de sangue revelavam serem parazitados por uma só especie de plasmodio.

Posteriormente, pesquizavam-se os quistos nesses mosquitos.

Kennord verificou na Guiana Ingleza a transmissão do impaludismo pelo *Cyclolepteron mediopunctatum,* nada adiantando sobre a especie do plasmodio transmitido por esta anofelina.

Quanto á transmissão pela *Myzomyia lutzi,* todos os fatos levam a crêr que seja uma especie perigoza, comtudo, falta ainda uma verificação exata; o ooquisto achado por Galli-Valerio numa *Myzomyia lutzi* conservada em alcool e remetida do Paraná, apenas aumenta a probabilidade desta anofelina transmitir impaludismo, porquanto, não ha quem possa diferenciar em um estomago de anofelina, principalmente conservado da maneira citada o plasmodio humano do plasmodio aviario.

Quanto á prezença de ooquinetos, referida por Stephen e Christophers, para a *M. lutzi* é uma observação que facilmente pode ser feita em qualquer anofelina, alimentada em gametoforos em condições de transmissibilidade; desta verificação não se deve concluir que o ooquineto possa sempre evoluir até esporozoito.

Especies bem suspeitas são as *Cellia brasiliensis Myzorhynchella lutzi* e *parva;* a *Stethomyia nimba* é, por ora, incriminada, por Low, de transmitir impaludismo na Guiana.

Stephens und Christophers (Practical study of Malaria, London 1908) führen als Malariaüberträger *Cellia albimana* aus Westindien und *Cellia argyrotarsis* aus Brasilien an; auf welche Autoritäten sie sich dabei stützen, ist uns zur Zeit unbekannt. Auf experimentellem Wege wurden hier zu Lande als Zwischenwirth festgestellt, für Tertiana maligna: *Cellia argyrotarsis* (Gomes de Faria, Ruy Ladislao), *Cellia albimana* (Ruy Ladislao), *Arribalzagaia pseudomaculipes* (Ruy Ladislao, Neiva), *Cyclolepteron intermedium* (Ruy Ladislao, Neiva), für Tertiana benigna: *Cellia albimana* (Chagas, Ruy Ladislao), *Cellia argyrotarsis* (Ruy Ladislao). Die Untersuchungen wurden auf folgende Weise vorgenommen: Die Anophelinen wurden mit dem Blute von Individuen ernährt, welche, wie durch wiederholte Untersuchungen festgestellt wurde, nur eine Art von Plasmodien und diese im Gametenzustand beherbergten. Später wurden dann in diesen Mücken die Oocysten aufgesucht. In British Guyana stellte Kennord die Transmission der Malaria durch *Cyclolepteron mediopunctatum* fest, ohne einen Aufschluss über die Plasmodiumart, welche übertragen wurde, zu geben.

Was die Uebertragung durch die *Myzomyia lutzi* anbetrifft, so deutet alles darauf hin, dass diese Art gefährlich ist, jedoch fehlt ein genauer Beweis dafür, denn die von Galli-Valerio bei in Alcohol aufbewahrten Mücken gefundenen Cysten, die von Paraná geschickt worden waren, können kaum als beweisend angesehen werden, da eine Unterscheidung zwischen vom Menschen oder von Vögeln abstammenden Haematozoen unter diesen Umständen kaum möglich sein dürfte.

Was die von Stephens und Christophers angeführte Beobachtung von Ookineten im Magen anbetrifft, so kann dieselbe leicht bei jeder Art von Anophelinen gemacht werden, wenn dieselben mit Blut von Gametenträgern genährt werden, ohne dass man daraus schliessen dürfte, dass der Ookinet sich auch zum Sporozoiten entwickeln würde.

Sehr verdächtig sind auch *Myzorhynchella Lutzi* und *parva; Stethomyia nimba* wird von Low der Uebertragung der Malaria in Guyana angeschuldigt.

Lejenda:

Anophelinae

Transmissoras provadas do impaludismo

- *Cyclolepteron medio punctatum*
- *Cellia albimana*
- *Cellia argyrotarsis*
- *Cyclolepteron intermedium*
- *Arribalzagaia pseudo maculipes*

Transmissoras provaveis do impaludismo

- *Myzomyia lutzi*
- *Arribalzagaia maculipes*
- *Cellia brasiliensis*
- *Myzorrhynchella parva*
- *Myzorrhynchella lutzi*
- *Stethomyia nimba*
- *Myzorrhynchella nigritarsis*
- *Myzomyia gilesi*
- *Myzomyia libia maculatu*
- *Manguinhosia lutzi*
- *Chagasia fajardoi*

Imp. Lith. Martinuzzo Reichenbach S. Paulo

No mapa apenso (Est. 4) damos a distribuição, por Estados, das anofelinas brazileiras; as lacunas ainda são imensas, entretanto, utilizamo-nos para a sua confeção de todas as informações colhidas por nós diretamente, ou por autores e observadores dignos de todo o credito.

Alguns mezes depois de prontas as notas precedentes, em Janeiro do corrente ano, tivemos a oportunidade de verificar nos campos de Avanhandava, no noroeste de São Paulo, a maneira de se comportar da *Cellia brasiliensis* que, em pleno dia, ao sol, num campo dezabrigado, ataca aos enxames, homens e animais; o mesmo acontecendo em dias chuvozos, quando, imediatamente apoz cessação da chuva ou até ainda chuviscando fracamente, aflue em verdadeiros enxames bem carateristicos desta especie que, neste particular em nada se parece com numerozos outros culícidas que já temos tido ocazião de estudar em identicas condições, não excetuando o *Taeniorhynchus albicosta* e os *Myzorhynchella parva* e *lutzi* que, embora afluam abundantemente, não enxameam como acontece com a *Cellia brasiliensis*.

Esta especie pouza sobre qualquer parte do corpo do cavalo, sem ter logar de preferencia como observámos e referimos para algumas outras anofelinas; neste ponto a *C. brasiliensis* procede do mesmo modo que as *C. argyrotarsis* e *albimana*.

Provavelmente é uma especie transmissora do impaludismo e, o que nos leva a esta supozição, é a prezença de impaludismo em localidades como Avanhandava, onde esta especie existe em abundancia extraordinaria, quazi que escluzivamente.

Tambem verificámos a existencia da *Manguinhosia lutzi* no noroeste de S. Paulo, junto ás marjens do rio Tieté; esta especie, até então, só tinha sido encontrada em Minas e, em ambas rejiões, sempre em companhia da *C. brasiliensis*.

Auf der beigefügten Karte ersieht man die Verbreitung der Anophelinen in den verschiedenen brasilianischen Staaten; die Lücken sind noch immer sehr gross, obgleich wir bei ihrer Anfertigung alle von uns direct gemachten oder zuverlässigen Beobachtern entnommenen Angaben verwendet haben.

Einige Monate nach Vollendung der vorangehenden Beobachtungen, im Januar dieses Jahres, hatten wir Gelegenheit, auf den Campos von Avanhandava, im Nordwesten von S. Paulo, die Gewohnheiten der *Cellia brasiliensis* zu verfolgen, welche am hellen Tage, bei Sonnenschein und auf offenem Felde Menschen und Tiere angreift. Auch an regnerischen Tagen geschah dasselbe, indem unmittelbar nach Aufhören des Regens oder bei noch schwachem Fortdauern desselben, diese Art in förmlichen Schwärmen auftrat, welche für dieselbe characteristisch sind. Dadurch unterscheidet sie sich vollkommen von den zahlreichen Mückenarten, die wir unter ähnlichen Bedingungen studiren konnten, nicht ausgenommen *Taenierhynchus albicosta, Myzorhynchella parva* und *M. Lutzi,* welche, obwohl zahlreich auftretend, doch nicht derartige Schwärme bilden. Unsere Art lässt sich, auf irgend einem Teile des Körpers der Pferde nieder, ohne eine bestimmte Stelle zu bevorzugen, wie wir diess bei anderen Anophelinen beobachtet und angeführt haben. Sie verfährt hierin ebenso, wie die *Cellia argyrotarsis* und *albimana*.

Diese Art ist wohl zweifellos im Stande, Malaria zu übertragen, wie wir aus dem häufigen Vorhandensein derselben an Orten, wie Avanhandava, schliessen, wo sie in ausserordentlicher Menge und nahezu ausschliesslich vorkommt.

Ausserdem hatten wir auch Gelegenheit, das Auftreten der *Manguinhosia Lutzi* an den Ufern des Tietés im Nordwesten von S. Paulo zu constatiren; diese Art war früher nur in Minas gefunden worden. In beiden Regionen kam sie immer in Gesellschaft der *Cellia brasiliensis* vor.